

**EVALUACIÓN DE LA MODULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS NSE Y S100 $\beta$  COMO  
POSIBLES BIOMARCADORES TEMPRANOS EN UN MODELO MURINO DE  
LESIÓN MEDULAR ESPINAL**

**CLAUDIA LILIANA CARBONELL GUTIERREZ**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de  
Biólogo**

**Director**

**ANGEL CÉSPEDES RUBIO  
PhD. CIENCIAS BÁSICAS BIOMEDICAS**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA  
IBAGUÉ – TOLIMA  
2018**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO**

**TÍTULO EVALUACIÓN DE LA MODULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS NSE Y S100 $\beta$   
COMO POSIBLES BIOMARCADORES TEMPRANOS EN UN MODELO MURINO  
DE LESIÓN MEDULAR ESPINAL**

AUTORES Claudia Liliana Carbonell Gutiérrez (070100362009)

DIRECTOR Ángel Céspedes Rubio (Universidad del Tolima)  
CO-DIRECTOR(ES)

JURADOS Edwin Fernando Buritica Gaviria (Universidad del Tolima)  
Liliana Francis Turner (Universidad del Tolima)

CALIFICACIÓN 4.6


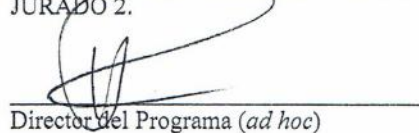
☒ APROBADO

☐ REPROBADO

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

FIRMAS

  
JURADO 1.  
  
Director del trabajo

  
JURADO 2.  
  
Director del Programa (*ad hoc*)

Ciudad y fecha: 26 de Julio de 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mis más valiosos agradecimientos a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo de grado como requisito previo para optar a mi título profesional.

Ante todo a Dios, quien es el único que conoce la razón por la que nos tiene en este mundo y conoce y guía cada uno de nuestros pasos.

A mi familia, en especial a mis padres, por su constante, fiel e inigualable apoyo y porque son ellos mi mayor inspiración para mi formación académica.

Al Dr. Ángel Céspedes Rubio, quien desde un principio en este largo camino, siempre me demostró una excelente disposición, y gracias a sus oportunas correcciones y orientaciones, que lograron en mí la experiencia académica y práctica que obtuve durante este proceso.

Al Dr. Iang Schroniltgen Rondón Barragán por su valiosa y oportuna colaboración

Al Dr. Carlos Augusto Rengifo por su labor prestada y disposición. Y al Dr. Juan Carlos Ortiz por su acompañamiento y aprendizaje

Y por último pero no menos importante, a todas aquellas personas integrantes del Laboratorio de Toxicología, del Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas (END) y del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular; sólo ellos saben todos los obstáculos que tuve que sobrepasar porque los vivieron conmigo, y sin ellos no hubiera podido, a todos ustedes mil y mil gracias, por haberse convertido en una pieza clave no solo en la culminación de este trabajo sino también en mi vida.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>13</b>
<b>1. OBJETIVOS.</b>	<b>15</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL.	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	15
<b>2. METODOLOGÍA.</b>	<b>16</b>
2.1 UNIDADES EXPERIMENTALES.	16
2.2 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.	17
2.3 PRUEBAS LOCOMOTORAS.	19
2.3.1 Locomoción en campo abierto.	19
2.3.2 Malla horizontal.	20
2.3.3 Análisis de la huella o footprint.	20
2.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO.	21
2.5 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.	23
2.6 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.	24
2.6.1 Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR).	24
2.6.2 Obtención de plasma sanguíneo.	24
2.6.2.1 Precipitación de proteínas del plasma con acetona al 75%.	24
2.6.3 Extracción medular.	25
2.7 WESTERN BLOT.	25
2.7.1 Cuantificación de proteínas.	25
2.7.2 Electroforesis.	26
2.7.3 Transferencia.	27
2.7.4 Incubación del anticuerpo primario.	28
2.7.5 Incubación del anticuerpo secundario HRP.	28
2.7.6 Detección.	28
2.8 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.	29

<b>2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b>	<b>29</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.</b>	<b>30</b>
<b>3.1 ANATOMÍA MACROSCÓPICA DE LA MÉDULA ESPINAL.</b>	<b>30</b>
<b>3.2 ESTRUCTURA DE LA MÉDULA ESPINAL.</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1 Sustancia gris.</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2 Sustancia blanca.</b>	<b>32</b>
<b>3.3 TRACTOS DE LA MÉDULA ESPINAL.</b>	<b>33</b>
<b>3.3.1 Tractos ascendentes de la médula espinal.</b>	<b>33</b>
<b>3.3.2 Tractos descendentes de la médula espinal.</b>	<b>35</b>
<b>3.4 VASCULARIZACIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL.</b>	<b>37</b>
<b>3.4.1 Sistema arterial.</b>	<b>37</b>
<b>3.4.2 Sistema venoso.</b>	<b>38</b>
<b>3.5 LESIÓN MEDULAR (LM).</b>	<b>39</b>
<b>3.5.1 Historia.</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2 Datos epidemiológicos.</b>	<b>42</b>
<b>3.5.2.1 Prevalencia.</b>	<b>43</b>
<b>3.5.2.2 Incidencia.</b>	<b>43</b>
<b>3.5.2.3 Etiología.</b>	<b>44</b>
<b>3.5.2.4 Edad.</b>	<b>45</b>
<b>3.5.2.5 Género.</b>	<b>46</b>
<b>3.5.2.6 Gravedad y nivel.</b>	<b>47</b>
<b>3.5.2.7 Costos.</b>	<b>48</b>
<b>3.5.3 Clasificación de la lesión medular.</b>	<b>48</b>
<b>3.5.4 Síndromes medulares.</b>	<b>49</b>
<b>3.5.4.1 Síndrome de Brown Séquard.</b>	<b>49</b>
<b>3.5.5 Fisiopatología de la lesión medular.</b>	<b>51</b>
<b>3.5.5.1 Fase primaria.</b>	<b>51</b>
<b>3.5.5.2 Fase secundaria.</b>	<b>52</b>
<b>3.5.6 Shock medular.</b>	<b>55</b>
<b>3.6 BIOMARCADORES.</b>	<b>56</b>

<b>3.6.1 Definición.</b>	<b>57</b>
<b>3.6.2 Características.</b>	<b>57</b>
<b>3.6.3 Biomarcadores en tejido, LCR, sangre y orina.</b>	<b>58</b>
<b>3.6.4 Clasificación de los biomarcadores.</b>	<b>59</b>
<b>3.6.4.1 Biomarcadores estructurales.</b>	<b>59</b>
<b>3.6.4.2 Biomarcadores inflamatorios.</b>	<b>59</b>
<b>3.7 ENOLASA.</b>	<b>59</b>
<b>3.7.1 Enolasa específica neuronal (NSE).</b>	<b>60</b>
<b>3.7.1.1 NSE en la lesión medular aguda.</b>	<b>60</b>
<b>3.7.1.2 NSE en células neuronales y gliales.</b>	<b>63</b>
<b>3.7.1.3 NSE en LCR y sangre.</b>	<b>63</b>
<b>3.8 S100.</b>	<b>64</b>
<b>3.8.1 S100<math>\beta</math>.</b>	<b>66</b>
<b>3.8.1.1 S100<math>\beta</math> en la inflamación.</b>	<b>70</b>
 <b>4. RESULTADOS.</b>	 <b>70</b>
<b>4.1 SDS-PAGE COMPARATIVO DE LAS PROTEÍNAS TOTALES EN PLASMA SANGUÍNEO DE RATONES CONTROL Y CON LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL EN FASE AGUDA (6 HORAS).</b>	<b>71</b>
<b>4.1.1 Precipitación de proteínas del plasma sanguíneo.</b>	<b>71</b>
<b>4.1.1.1 Separación de la proteína NSE en plasma sanguíneo.</b>	<b>72</b>
<b>4.1.1.2 Separación de la proteína S100<math>\beta</math> en plasma sanguíneo.</b>	<b>73</b>
<b>4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS NSE Y S100<math>\beta</math> EN TEJIDO MEDULAR DE RATONES CONTROL Y LESIÓN 6 HORAS DESPUÉS DE LA LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL MEDIANTE WESTERN BLOT.</b>	<b>73</b>
<b>4.2.1 Perfiles de identificación de los niveles de la proteína NSE en médula.</b>	<b>73</b>
<b>4.2.2 Perfiles de identificación de los niveles de la proteína S100<math>\beta</math> en médula.</b>	<b>75</b>
<b>4.3 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA DE RATONES CONTROL Y LESIONADOS 6 HORAS DESPUÉS DE LA LESIÓN DE LA MÉDULA.</b>	<b>79</b>
<b>4.3.1 Mediciones de la función locomotora en campo abierto del movimiento de la pata posterior izquierda y posición del tronco de ratones control y lesión de la médula espinal.</b>	

	<b>79</b>
<b>4.3.2</b> Niveles del número de pasos fallidos de la pata posterior izquierda en la malla horizontal de ratones control y lesión de la médula espinal.	<b>80</b>
<b>4.3.3</b> Mediciones de la función locomotora mediante un análisis de la huella (Footprint).	<b>81</b>
<b>4.4</b> HISTOPATOLÓGICA DEL TEJIDO MEDULAR DE RATÓN LESIONADO 6 HORAS DESPÚES DEL TRAUMA DE LA MÉDULA ESPINAL MEDIANTE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.	<b>83</b>
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	<b>86</b>
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>102</b>
<b>RECOMENDACIONES.</b>	<b>103</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Procedimientos quirúrgicos de lesión medular.	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b> Parámetros del análisis de la huella o footprint.	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Análisis histológico.	<b>22</b>
<b>Figura 4.</b> Organización longitudinal de la médula espinal (segmentos cervical, torácico y lumbar), vértebras espinales y nervios espinales.	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Tractos de la médula espinal.	<b>36</b>
<b>Figura 6.</b> Vascularización de la médula espinal.	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Síndrome de Brown-Séquard.	<b>51</b>
<b>Figura 8.</b> Efectos adversos de NSE después de la lesión medular.	<b>61</b>
<b>Figura 9.</b> Expresión de NSE en la migración, supervivencia y crecimiento celular.	<b>63</b>
<b>Figura 10.</b> Proteínas S100.	<b>65</b>
<b>Figura 11.</b> Interacciones S100 $\beta$ /IQGAP1/Src/PI3K/EGF.	<b>68</b>
<b>Figura 12.</b> Funciones de S100 $\beta$ en el SNC.	<b>69</b>
<b>Figura 13.</b> SDS-PAGE comparativo de las muestras de plasma de ratón precipitadas con acetona al 75%.	<b>72</b>
<b>Figura 14.</b> Niveles de NSE de tres segmentos medulares, A, M, P en ratones control vs. lesión medular 6 horas después del trauma.	<b>74</b>
<b>Figura 15.</b> Niveles de NSE en los grupos control vs. lesión medular 6 horas después del trauma.	<b>75</b>
<b>Figura 16.</b> Niveles de S100 $\beta$ de tres segmentos medulares, A, M, P en ratones control vs. lesión medular 6 horas después del trauma.	<b>76</b>
<b>Figura 17.</b> Niveles de S100 $\beta$ en los grupos control vs. lesión medular 6 horas después del trauma.	<b>77</b>
<b>Figura 18.</b> Niveles de S100 $\beta$ en los segmentos medulares medios control vs. Lesión.	<b>78</b>
<b>Figura 19.</b> Mediciones de la función locomotora en campo abierto de ratones control vs. lesión medular 6 horas después del trauma.	<b>80</b>



<b>Figura 20.</b> Niveles del número de pasos fallidos de la pata posterior izquierda en la malla horizontal de ratones control y lesión de la médula espinal.	<b>81</b>
<b>Figura 21.</b> Mediciones de la función locomotora mediante análisis de la huella de ratones control y lesión de la médula espinal 6 horas después del trauma.	<b>82</b>
<b>Figura 22.</b> Distancia entre extremidades anteriores y posteriores del análisis de la huella en ratones control y lesión.	<b>83</b>
<b>Figura 23.</b> Microfotografías representativas de cortes medulares de ratón a seis (6) horas de inducida una lesión penetrante con aguja fina a nivel vertebral T9.	<b>85</b>

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo A.</b> Puntuaciones de la función locomotora en campo abierto.	<b>112</b>
<b>Anexo B.</b> Protocolo para la recolección de LCR.	<b>113</b>
<b>Anexo C.</b> Protocolo para la tinción con azul de coomassie.	<b>114</b>
<b>Anexo D.</b> Preparación de membranas PVDF para Western blot.	<b>115</b>
<b>Anexo E.</b> Protocolo stripping suave.	<b>116</b>

## RESUMEN

La lesión de la médula espinal se caracteriza por un daño primario que conlleva a muerte celular, seguido de una cascada de eventos celulares y moleculares degenerativos que incrementan la lesión.

Se hace necesario dilucidar los mecanismos biológicos subyacentes a la muerte celular progresiva después de la Lesión Medular (LM), los eventos bioquímicos del proceso neurodegenerativo y la posible modulación de proteínas durante la etapa temprana de daño tisular. Varios estudios sobre lesión medular traumática en humanos y animales se han centrado en la identificación y monitoreo de biomarcadores específicos, principalmente proteínas provenientes de células neuronales o gliales que se liberan al suero sanguíneo y al líquido cefalorraquídeo (LCR), de tal manera que permitan diagnosticar y predecir de manera temprana el tipo, la gravedad y el curso de la LM.

En el presente trabajo se evaluó la lesión traumática de la médula espinal inducida por una lesión medular unilateral en ratones ICR-CD1 así como la modulación de dos proteínas implicadas en el daño de los cordones espinales en muestras de plasma sanguíneo y tejido medular lesionado. Como hipótesis de trabajo, se planteó la modulación de la proteína enolasa específica neuronal (NSE), la cual posee actividad enzimática glucolítica, sintetizada predominantemente en el citoplasma de neuronas y células endocrinas; igualmente, se planteó la hipótesis de que otra proteína denominada S100 $\beta$ , se modularía a pocas horas de ocasionada la lesión. Esta última, es sintetizada principalmente en las células astrogliales y de Schwann.

Mediante análisis bioquímico utilizando la técnica de Western blot, se logró establecer, la relación entre el daño celular inducido por la lesión espinal y la modulación temprana de la NSE, más no de la S100 $\beta$  a escasas seis horas de ocasionado el trauma.

**Palabras clave:** Lesión medular, Biomarcadores, NSE, S100 $\beta$

## ABSTRACT

Spinal cord injury is characterized by a primary damage that leads to cell death, followed by a cascade of degenerative and cellular molecular events that increase the injury.

It is necessary to elucidate the biological mechanisms underlying progressive cell death after spinal cord injury (SCI), the biochemical events of the neurodegenerative process and the possible modification of proteins for the early stage of tissue injury. Several studies on traumatic spinal cord injuries in humans and animals have focused on the detection and control of specific biomarkers, mainly neuronal proteins or glial cells that are released into the blood serum and cerebrospinal fluid (CSF), so that they can diagnose and predict the type, severity and course of SCI.

In the present work, the traumatic spinal cord injury induced by a unilateral spinal cord injury in ICR-CD1 mice was evaluated, as well as the modulation of the proteins involved in spinal cord damage in blood plasma samples and injured medullary tissue. As a working hypothesis, the modulation of the neuronal specific enolase protein (NSE), which possesses glycolytic enzymatic activity, synthesized predominantly in the cytoplasm of neurons and endocrine cells, was proposed; In addition, the hypothesis was proposed that the S100 $\beta$  protein could be modulated by the effect of the injury; the latter protein is synthesized mainly in the astroglial and Schwann cells.

By means of a biochemical analysis using the Western blot technique, it was possible to establish the relationship between the cellular damage induced by the spinal injury and the early modulation of the NSE, but not of the S100 $\beta$  within six hours of the trauma.

**Keywords:** Spinal cord injury, biomarkers, NSE, S100 $\beta$

## INTRODUCCIÓN

Se estima que a nivel mundial la prevalencia anual del trauma de médula espinal está por el orden de 10,8 a 83 casos por cada millón de habitantes, lo cual permite calcular que para los 7.500'000.000 como población censada en noviembre de 2017, se habrían presentado entre 81.000 a 622.500 casos en el presente año. De cada 14.000 personas que sufren trauma medular, 4.200 mueren antes de llegar al hospital y 1.500 pacientes fallecen durante la atención hospitalaria (Yokobori et al., 2015). En la mayoría de los casos, las lesiones medulares son el resultado de acciones violentas, accidentes automovilísticos, caídas y actividades deportivas (Khetani et al., 2017).

El Trauma Raquimedular (TRM) es un proceso que implica una lesión primaria del tejido, de tipo mecánico, que provoca deformación y posteriormente necrosis y otras lesiones secundarias producto de múltiples eventos celulares y moleculares, como isquemia, edema, excitotoxicidad, inflamación, desequilibrio electrolítico, daño tisular por liberación de radicales libres y apoptosis (Li et al., 2014).

A pesar de los avances en el conocimiento de la patogénesis de la LM traumática, ha sido difícil el control de las lesiones, generando consecuencias devastantes tanto para el individuo como para la sociedad, por la discapacidad resultante con afectación motora, déficit neurológico y pérdida en la calidad de vida (Kwon et al., 2010).

La investigación en el tratamiento del TRM, basada en el conocimiento actual de los mecanismos primarios y secundarios, ha buscado el desarrollo de intervenciones terapéuticas tempranas que atenúen el efecto de estos mecanismos fisiopatológicos. El manejo inicial del TRM empieza en el mismo sitio del trauma y está encaminado a optimizar las condiciones respiratorias y hemodinámicas del paciente. Dentro de la intervención farmacológica temprana se ha descrito, por su efecto protector en pacientes con TRM, el uso de metil-predisolona, antagonistas de los opiáceos, del receptor de glutamato y de los canales iónicos; sin embargo, aún no se ha identificado ninguna

intervención que modifique el pronóstico en forma significativa. (Plaza, Pacheco, Aguilar, Valenzuela, & Pérez, 2012).

El diagnóstico temprano de la LM, es crucial para atender oportunamente los eventos fisiopatológicos primarios que atenúen o detengan la progresión de la patología, por lo cual se busca una prueba temprana y precisa que ayude a establecer el grado de la lesión axonal, además de profundizar en estudios bioquímicos y celulares sobre la fisiopatología del trauma. La Resonancia Magnética convencional (RM) es actualmente la mejor herramienta para el diagnóstico de lesiones asociadas al trauma, y la combinación de esta con el examen neurológico resulta en una predicción más certera; sin embargo, este último se considera poco fiable dentro de las primeras horas, dado que los cambios neurológicos de mayor severidad aparecen con el tiempo y no en forma aguda.

Por lo anterior, se hacen esfuerzos en la búsqueda de nuevos biomarcadores diagnósticos de lesión en el sistema nervioso central, incluyendo el trauma craneoencefálico y el trauma raquimedular, que permitan un diagnóstico temprano de la fase aguda de la lesión medular; sin embargo, debido al amplio número de moléculas implicadas en la lesión, no hay consenso acerca de cuál o cuáles biomarcadores ofrecen mayor predictibilidad del estado y progreso de la lesión. Quizá, los biomarcadores puedan proporcionar una medida útil de la intensidad del daño en la médula espinal durante la etapa temprana de la lesión, lo cual además de mejorar el diagnóstico, permiten avanzar en neuroprotección y en la búsqueda de posibles blancos terapéuticos para la restauración del tejido nervioso afectado (Kwon, Casha, Hurlbert, & Yong, 2011; Yokobori et al., 2015).

En el presente trabajo, se evaluaron los efectos celulares y bioquímicos en las primeras horas (6 horas) del trauma medular, a través de la medición en la modulación de los niveles de las proteínas NSE y S100 $\beta$  presentes en el epicentro del tejido medular espinal lesionado y en los segmentos anterior y posterior a éste; también se evaluó su presencia en plasma sanguíneo y LCR.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los niveles de la proteína enolasa específica neuronal (NSE) y la proteína glial S100 $\beta$  en plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo (LCR) y tejido medular, en un modelo de trauma medular espinal en ratones ICR-CD1, como posibles biomarcadores tempranos de daño.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Establecer mediante la técnica de inmunoblotting (Western blot) los niveles de las proteínas NSE y S100 $\beta$  en el plasma sanguíneo y el LCR en la fase aguda (6 horas) de ratones sometidos a lesión medular.

Determinar mediante la técnica de inmunoblotting (Western blot) y por inmunofluorescencia indirecta, los efectos del trauma raquimedular sobre la modulación temprana (6 horas) de las proteínas NSE y S100 $\beta$  en la médula espinal.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) (n=21), stock ICR-CD1 (Albino-Charles River Lab.), procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), hembras entre 6 y 8 semanas de edad, con un peso promedio de 28 g al inicio del experimento. 10 ratones fueron dispuestos para el grupo experimental sin pérdidas, 8 ratones para el grupo control y 3 ratones de reposición por complicaciones quirúrgicas. Los animales fueron mantenidos durante al menos una semana en una unidad adecuada del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, antes de la realización de los procedimientos como etapa de adaptación. Los sujetos experimentales fueron alojados en jaulas de policarbonato (5 animales por jaula, para minimizar el estrés de aislamiento) ubicados en un cuarto con condiciones adecuadas de temperatura (22-24 °C) y humedad ambiental (70%), con ciclos controlados de luz/oscuridad (12:12 horas), disponibilidad de agua azucarada a voluntad y ración diaria de alimento comercial para roedores (5 g/animal/día).

Todos los experimentos se hicieron bajo la aprobación del Comité Local de Bioética de la Universidad del Tolima, en concordancia con lo sugerido por La Red Colombiana de Comités Institucionales Para el cuidado y Uso de Animales (CICUALES, 2010), siguiendo las normas internacionales de protección y manejo de animales de laboratorio descritas en el “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (Clark, Gebhart, Gonder, Keeling, & Kohn, 1997) y atendiendo a la Ley 1774 de 2016, por medio de la cual se modifican el código civil, la Ley 84 de 1989, el código penal, el código de procedimiento penal y se dictan otras disposiciones de protección animal en Colombia (Estatuto Nacional de Protección de los Animales, 1989).



**Tabla 1.** Diseño experimental de los grupos tratados.

	GRUPO EXPERIMENTAL		GRUPO CONTROL	
	LESIONADOS		SIMULADOS	
	Inmunofluorescencia	Inmunoblotting	Inmunofluorescencia	Inmunoblotting
<b>NSE</b>	n = 5	n = 5	n = 4	n = 4
<b>S100<math>\beta</math></b>				

9 animales de los grupos experimental y control se destinaron para evaluar la presencia de la proteína NSE y la proteína S100 $\beta$  en inmunofluorescencia y el resto se utilizó para los análisis bioquímicos (Western blot) de detección y modulación de NSE y S100 $\beta$  en ambos grupos (experimental y control). Los animales del grupo control fueron sometidos a las mismas condiciones del grupo experimental de anestesia y de abordaje quirúrgico, incluyendo laminectomía, pero sin lesión medular (simulados).

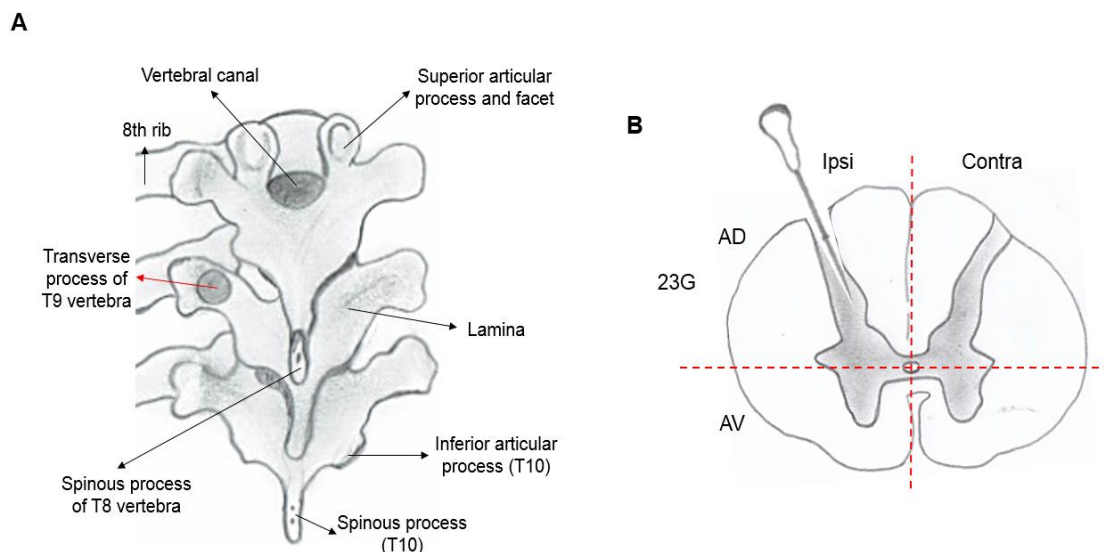
## 2.2 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

Según el procedimiento quirúrgico con adaptaciones elaboradas por el Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas (END) de la Universidad del Tolima, se realizó un modelo de lesión medular unilateral mediante una laceración puntual con una aguja estéril calibre (23 G).

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia somática profunda mediante la asociación xilacina 2% (Rompun®- Bayer S.A.) 8 mg/kg p.c. / ketamina 10% (Imalgene® 1000 - Merial) 113 mg/kg p.c. vía intraperitoneal. Después de inducir un plano quirúrgico de anestesia, se preparó el área dorsal mediante afeitado y antisepsia con etanol 70%. Cada animal recibió 1 mL de solución Lactato de Ringer USP (Baxter Viaflex) / dextrosa al 5% USP (Baxter Viaflex) 1:1 vía intraperitoneal, con el fin de compensar las posibles pérdidas en la volemia durante el procedimiento quirúrgico.

Se realizó una incisión cutánea a lo largo de la línea media dorsal y a continuación, divulsión de los músculos paravertebrales exponiendo las vértebras torácicas a nivel de los segmentos T8-T10, la médula espinal se exhibió a través de la laminectomía a nivel del segmento vertebral T9 sobre la apófisis transversa izquierda mediante un Mototool tipo lápiz (Multifunction Plier A414-DC-3BG) con fresa de diamante grano extrafino v/20-30 (Teng Yuang ISO FO-22EF), bajo estereomicroscopio (Motic SMZ-168 Series) (Figura 1A). Una vez expuesta la médula espinal, se realizó una punción con una aguja hipodérmica estéril calibre (23 G) en el área dorsal izquierda de la médula espinal. La aguja se insertó, con el lado posterior del bisel adyacente al lado dorsal de la médula, hasta que tocó la superficie ventral interna del cuerpo vertebral (T9) durante 1 minuto (Figura 1B), y la lesión se verificó microscópicamente por deformación del tejido y separación de las fibras sin hemorragia, descrita como laceración puntual sin daño adicional al hemisegmento contralateral.

**Figura 1.** Procedimientos quirúrgicos de lesión medular. A) Laminectomía en T9 sobre la apófisis transversa izquierda. B) Lesión medular unilateral mediante punción con aguja calibre (23G).



Fuente: Adaptado de Filler (2014)

Se aplicó tópicamente 0,02 mL de epinefrina (PharmaGen) 1 mg/mL sobre la cavidad medular lesionada y esta se rellenó con un pequeño segmento de 4 x 2 mm aproximadamente de gelatina sintética absorbible tipo quirúrgico comercial (Gelfoam Size 100 Pfizer) como hemostático local; los músculos y la piel se suturaron en planos independientes, utilizando material de sutura monofilamento no absorbible (Polipropileno – Prolene® 6-0) y se aplicó tópicamente Rifamicina sódica 1 % (Rifocina® Spray x 30 mL). Una vez finalizada la intervención quirúrgica, los animales se alojaron por separado en cajas de recuperación anestésica con almohadillas térmicas y con observación permanente, hasta que estuvieron alerta y móviles, para posteriormente administrarles vía subcutánea fentanilo (Lab. AC Farma S.A.) 0,01 mg/kg diluido en NaCl al 5% (Baxter-Viaflex al 0,9 & USP) para controlar el dolor postoperatorio. Los ratones fueron devueltos al alojamiento estándar con comida y agua *Ad Libitum* siendo monitoreados cada 30 minutos durante las 6 horas posteriores a la lesión.

## **2.3 PRUEBAS LOCOMOTORAS**

Se decidió incluir los aspectos de evaluación neurológica aunque estos no hicieron parte de los objetivos específicos del trabajo, se realizaron pruebas de locomoción, tras la LM, antes del sacrificio a las 6 horas, para asociar el grado de déficit funcional con la gravedad de la lesión. Para evaluar la recuperación de la función locomotora, se eligieron tres pruebas: locomoción en campo abierto, caminata en malla horizontal y análisis de la huella o footprint.

**2.3.1 Locomoción en campo abierto.** Todos los animales del grupo Control y Lesión fueron evaluados para determinar la función locomotora, de acuerdo a los criterios establecidos para esta prueba y basados en el protocolo de Basso Mouse Scale (BMS), (Basso et al., 2006), con adaptaciones elaboradas por el Grupo de Investigación END de la Universidad del Tolima (Anexo A). Para esta prueba se utilizó un recipiente de plástico con dimensiones de 45 cm de largo x 30 cm de ancho, en una habitación sin ruido, con iluminación, en la cual dos examinadores cegados del grupo lesión evaluaron cada animal durante un periodo aproximado de 4 minutos, proporcionando cada uno una

puntuación numérica para cada variable evaluada. Esta escala estandarizada varió de menor a mayor número, siendo 0 el equivalente a la parálisis completa del miembro posterior izquierdo y el número mayor (4, 7, 8) equivalentes a la movilidad normal de la misma extremidad.

**2.3.2** Malla horizontal. Esta prueba se adaptó para evaluar la propiocepción y coordinación de los ratones caminando sobre una malla elevada con aberturas de 1.8 x 1.6 cm (Jin, Bouyer, Haas, & Fischer, 2013). Solo aquellos que demostraron un apoyo plantar constante fueron probados en la malla. Cada ratón fue grabado durante 1 minuto y se contó una falla, cuando la pata posterior izquierda sobresalió completamente por la malla con todos los dedos del pie y el talón extendido por debajo de la superficie de la malla.

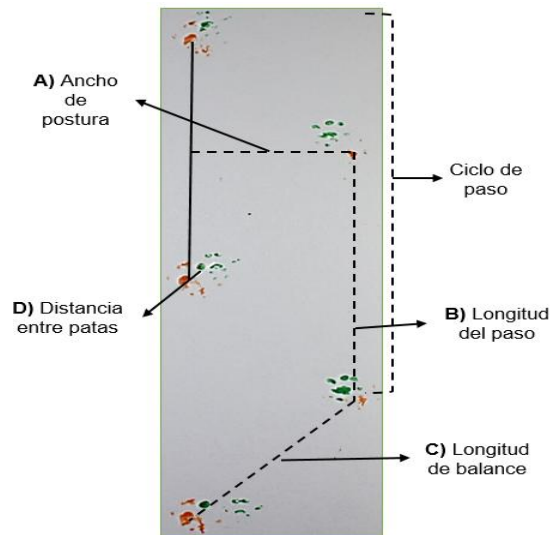
**2.3.3** Análisis de la huella o footprint. Para detectar posibles alteraciones en el desplazamiento, más allá de lo reconocido por las puntuaciones de la locomoción en campo abierto, se utilizó un análisis cuantitativo de la marcha. La prueba se realizó mediante un análisis de huella, con adaptaciones elaboradas por el Grupo de Investigación END de la Universidad del Tolima. Para evaluar los patrones de pasos de las extremidades anteriores y posteriores durante la locomoción hacia delante, se requirieron ratones con un apoyo plantar constante que atravesaron una pista recta, bien iluminada, de 90 cm de largo x 4 cm de ancho y 11 cm de altura, terminando en una caja oscura al otro extremo.

El fondo de la pista estaba revestida con papel blanco y las patas delanteras y traseras estaban marcadas con pintura verde y anaranjada, respectivamente. Se requirieron dos pasadas por la pista, y se determinó un mínimo de 5 ciclos de pasos continuos (distancia de un par de impresiones de las extremidades anteriores a la siguiente, con un conjunto acompañante de impresiones de las extremidades posteriores) por ratón (Ma, Basso, Walters, Stokes, & Jakeman, 2001; Matyas et al., 2017).

El análisis se basó en los siguientes parámetros:

- Ancho de postura: se traza una línea recta sobre un paso y se traza una línea perpendicular desde la pata contraria al paso
- Longitud del paso: se midió entre dos impresiones consecutivas para cada pata posterior y anterior del mismo lado, los lados derecho e izquierdo se midieron por separado
- Longitud de balance: es la distancia entre las marcas plantares de las dos extremidades posteriores contralaterales
- Distancia entre patas anteriores y posteriores: es la distancia entre la impresión de la pata anterior y de la pata posterior de cada ciclo completo del mismo lado (Figura 2).

**Figura 2.** Parámetros del análisis de la huella o footprint. A) Ancho de postura. B) Longitud del paso. C) Longitud de balance. D) Distancia entre patas anteriores y posteriores.



Fuente: Autor

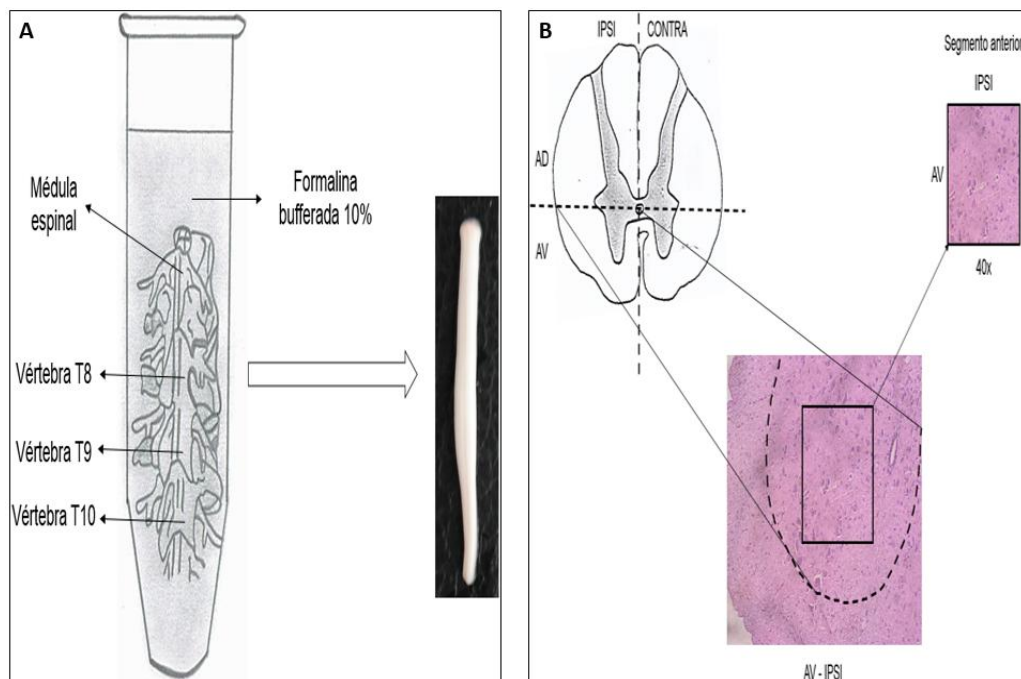
## 2.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para los estudios histopatológicos se utilizó la tinción de Hematoxilina–Eosina (H-E) bajo el protocolo del Laboratorio de Histología del Profesor Carlos Augusto Rengifo con el fin de evaluar la supervivencia celular y la localización topográfica de la lesión en la médula

espinal antes de realizar los estudios de inmunofluorescencia. A las 6 horas de intervenidos, 9 ratones destinados a análisis de inmunofluorescencia de los grupos control y lesión, se anestesiaron con una sobredosis de la mezcla xilacina 2% (Rompun®- Bayer S.A.) 8 µg/g p.c. y pentobarbital sódico (Invet S.A.) 130 µg/g p.c. con jeringa de insulina (1 c.c) vía intraperitoneal, produciendo inconsciencia plena y anestesia somática profunda.

A continuación, los ratones fueron rápidamente decapitados y la columna vertebral a nivel de los segmentos T8, T9, T10, se introdujo en formalina bufferada al 10% durante 48 horas y luego se extrajo la médula espinal. Se realizaron cortes coroneales en serie de 5 µm de grosor en micrótopo de los bloques de parafina que contenían la médula espinal a partir de 3 mm anteriores y posteriores al epicentro de la lesión, incluyendo este último. Las secciones se montaron sobre portaobjetos para realizar los procedimientos de tinción con H-E.

**Figura 3.** Análisis histológico. A) Fijación y extracción medular. B) Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E).



Fuente: Adaptado de Healthwise (2017)

La mayor extensión de la lesión y menor cantidad de materia blanca visible fue designada como epicentro. Incluyendo en este estudio aquellas secciones que tenían una disrupción histológica de la mitad lateral izquierda del asta dorsal de la médula espinal. Las láminas se analizaron bajo microscopio triocular invertido (Olympus IX73P2F). Las fotos se tomaron a través del objetivo 40x y cada sección de corte coronal medular de los diferentes segmentos (anterior, medio y posterior) se dividió en astas dorsales, (AD) y astas ventrales, (AV), comparando cada una de estas astas con el lado contralateral a la lesión (Figura 3B).

## **2.5 INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA**

Siguiendo el protocolo del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, las láminas gelatinizadas con los cortes de los segmentos anterior, epicentro y posterior se fijaron en isopropanol durante 1 minuto. Estas se lavaron 3 veces con solución salina fosfato bufferada (PBS 1X pH 8.0) , sin tritón, a temperatura ambiente por 1 minuto para hidratar, seguido de tres lavados con solución PBS 1X pH 8.0, con tritón, durante 5 minutos, para permeabilizar. A continuación las láminas se incubaron con de solución bloqueo (PBS 1X – BSA 5% - Tritón 0,3%) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, los cortes se dejaron incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario respectivo, Anti-ENO1 + ENO2 + ENO3 polyclonal – rabbit en dilución 1:500 (Abcam 105053) y Anti-S100 $\beta$  oligoclonal – rabbit/IgG en dilución 1:250 (ThermoFisher 710363), diluidos en solución de incubación (PBS 1X – BSA 1% - Tritón 0,3%). Finalmente se incubaron las láminas durante 1 hora con el anticuerpo secundario rabbit, dilución 1:2000, acoplado a un fluoróforo Alexa - Flúor 546, protegiéndolos de la luz y luego 7 lavados (PBS 1X, sin tritón) durante 2 minutos.

Estando aun húmedos los cortes y 30 minutos antes de terminar la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo, se adicionó a cada lámina, el marcador fluorescente Hoetchs 33258, dilución 1:40.000, para la contratinción nuclear. Las láminas

se sellaron con medio acuoso antifluorescente (Gel/Mount) y luego de 24 horas de estabilización protegidas de la luz, fueron analizadas bajo microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss Axiolab A1) y las imágenes fueron capturadas con cámara digital (AxioCam ERX-5S).

## **2.6 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

**2.6.1** Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR). Los 9 ratones restantes provenientes de los grupos experimental y control destinados a análisis bioquímico (Western blot), fueron sacrificados igualmente a las (6) horas de intervenidos y con el mismo protocolo anestésico, pero una vez anestesiados se realizó la recolección de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) por medio de la técnica punción de la cisterna magna basados en Liu & Duff (2008) (Anexo B).

**2.6.2** Obtención de plasma sanguíneo. Después de la decapitación se obtuvo por cada ratón, aproximadamente 1 mL de sangre venosa periférica en tubos con EDTA de 2 mL (BD Vacutainer®) para la posterior obtención de plasma sanguíneo, dejando el tubo inclinado y a 4°C durante 30 minutos. Las muestras de sangre se centrifugaron (Centrifuga refrigerada Eppendorf 5424 R) 15 minutos a 15.000 r.p.m. a 4 °C, obteniéndose aproximadamente 300 µL de sobrenadante por muestra; el plasma obtenido se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

**2.6.2.1** Precipitación de proteínas del plasma con acetona al 75%. Se sacaron 60 µL de plasma en tubos eppendorf de 1,5 mL y se agregaron tres volúmenes de acetona fría (180 µL), que se incubaron toda una noche sobre hielo a 4 °C. Al siguiente día, se sacó la fracción blanca resuspendida y la acetona restante se dejó secar en Cabina de extracción de gases (ESCO Model EFH-4 A2) sobre hielo durante 30 minutos. El pellet se reconstituyó con TBS 1X a pH 7,2 con el mismo volumen inicial del plasma (60 µL), se vorticó (Vortex VELP Scientific RX3) y centrifugó 30 minutos a 10.000 g y los sobrenadante se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis bioquímico (Bueno et al., 2011).



**2.6.3 Extracción medular.** Una vez se decapitaron los ratones y después de la extracción de muestras de LCR y sangre, rápidamente se extrajo la médula espinal, aplicándose presión mediante aire comprimido con una jeringa de 50 mL en el extremo craneal del canal vertebral, siendo expulsada la médula espinal a través del extremo caudal, en una longitud aproximada de 10 mm a nivel de los segmentos vertebrales T8, T9, T10, incluyendo el epicentro de la lesión y el tejido inmediatamente anterior y posterior al mismo, siendo cada segmento de aproximadamente 3 mm. Se realizó un pool de segmentos medulares de ambos grupos (control y lesión) distribuidos de la siguiente manera: médula anterior control (MACTR), médula media control (MMCTR), médula posterior control (MPCTR), médula anterior lesión (MALSN), médula media lesión (MMLSN) y médula posterior lesión (MPLSN).

Los segmentos medulares se homogenizaron en un eppendorf de 1,5 mL con 150  $\mu$ L de tampón de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Tris HCl 50 mM), que se suplementó con un coctel de inhibidor (Ortovanadato de Na 100  $\mu$ M, Inhibidores de proteasas 2X Sigma Fast e Inhibidores de fosfatasa 0,5 M), manteniendo siempre la cadena de frío. A continuación se centrifugaron por 10 minutos a 15.000 r.p.m. se volvieron a homogenizar y se centrifugaron por última vez por 20 minutos a 15.000 r.p.m. y se tomaron cuidadosamente los sobrenadantes.

## **2.7 WESTERN BLOT**

Este protocolo está basado en la guía para el desarrollo de Western blot (Abcam®), con adaptaciones realizadas en el Laboratorio de Toxicología y por el Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas (END).

**2.7.1 Cuantificación de proteínas.** A partir del método de Bradford (Bio–Rad), en una placa multipozos (96 pozos), de fondo plano, se sirvieron 5  $\mu$ L de proteína de la curva de calibración de BSA (Albumina sérica bovina) y de cada muestra (médula y plasma) por duplicado. En penumbra se preparó una mezcla de 24,5  $\mu$ L de reactivo A + 0,5  $\mu$ L de reactivo S por cada pozo y el reactivo B (200  $\mu$ L/pozo) se adicionó puro (Reactivos DC

Protein Assay, BioRad). Las muestras se homogenizaron con pipeta (Pipeta de precisión BOECO Germany de 200 uL) y se incubaron durante 15 minutos. En la placa multipozos, se agitó 10 segundos y se leyó en el lector de microplacas para absorbancia/ELISA (Bio-Rad iMark™) a 595 nm a los 20 minutos. El sobrenadante restante de las muestras se conservó a -20° C.

**2.7.2 Electroforesis.** Se sacaron los sobrenadantes de plasma y los lisados de los pool de médula de -20° C y una vez descongelados se vorticaron. Según los datos obtenidos en la cuantificación de proteínas, se adicionó para cada muestra en un vial de 0,5 mL los volúmenes indicados de agua desionizada y buffer de carga (Laemmli 2X). Se realizó un pequeño agujero en la tapa de cada vial y se colocaron en el baño termostático de agua de 22 L (Mod. BA22) durante 5 minutos a 95° C.

Para evaluar los niveles de las proteínas NSE y S100β en los segmentos medulares se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Dodecilsulfato sódico) al 12%, de 10 carriles, cargando cantidades iguales de proteína (20 µg) en 15 µL de volumen total. Las muestras de plasma se corrieron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 18%, de 15 carriles, cargando 20 µg de proteína en 9 µL de volumen total. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado para analizar ambas proteínas (NSE y S100β).

- Parámetros del corrido electroforético: inicialmente se configuró la fuente de alimentación de alta corriente (PowerPac™ HC) a 90 (V) voltios durante 40 minutos. A continuación se programó a 110 (V) voltios por 90 minutos, permitiendo un mayor corrido de las proteínas en el gel.

Se decidió teñir los geles de electroforesis para visualizar la separación y bandeo de las proteínas en las muestras de plasma y médula, mediante la tinción con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) basado en el protocolo del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Tolima (Anexo C).

**2.7.3 Transferencia.** Una vez finalizada la electroforesis se retiraron los geles, y se recortaron las membranas: de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (Bio Rad) para medir NSE de peso molecular de 48 kDa y membranas Difluoruro de polivinilideno - PVDF (Immobilon<sup>®</sup> -PSQ Transfer Membrane, Millipore) para medir S100 $\beta$  cuyo peso molecular es bajo, 11 kDa. Se humedecieron las membranas y el módulo de transferencia (Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell) en tampón de transferencia 1X pH 7,2 para armar el paquete de transferencia (módulo base del montaje, casete sostenedor mini gel, almohadillas de espuma, papel grueso de filtro). Las membranas PVDF para evaluar la proteína S100 $\beta$  se humedecieron de manera diferente según la guía de la casa comercial (Millipore) (Anexo D) y se utilizó tampón de transferencia sin SDS. Una vez armado el paquete, se cerró el casete sostenedor y se montó en el módulo base dentro del tanque de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell) para iniciar la transferencia.

- Parámetros de transferencia: se configuró la fuente de alimentación de alta corriente (PowerPac<sup>™</sup> HC) en 0,30 (A) amperios durante 2 horas para la transferencia de las proteínas en los geles a las membranas de nitrocelulosa para medir la proteína NSE y 0,20 amperios durante 90 minutos para la transferencia de las proteínas en los geles a las membranas PVDF para medir la proteína S100 $\beta$ .

Una vez finalizada la transferencia, se retiraron las membranas de nitrocelulosa y se sumergieron en Rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos en incubadora (Memmert GmbH+Co.KG) a 40°C para verificar que la transferencia se realizó correctamente, observando la presencia de proteínas marcadas por el colorante. Se procedió a lavar varias veces la membrana con agua destilada hasta remover por completo el colorante, seguido de tres (3) lavados con TBS. Las membranas PVDF no se tiñeron con Rojo Ponceau S.

A continuación se bloquearon los sitios inespecíficos de las proteínas sumergiendo las membranas en solución bloqueo (BSA, albumina sérica bovina diluida en TBS-T 0,05%) en un recipiente plástico, en agitación constante (Orbitron rotator 2 model 260250 BOEKL Scientific) a temperatura ambiente. Las membranas de nitrocelulosa se

sumergieron en solución bloqueo al 6% durante 2 horas, mientras que las membranas PVDF se sumergieron en solución bloqueo al 2% durante 1 hora.

**2.7.4** Incubación del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios requeridos para Western blot, fueron, Anti- $\beta$ -Actin monoclonal – mouse en dilución 1:1000 (Sigma-Aldrich 1978), Anti-ENO1 + ENO2 + ENO3 polyclonal – rabbit en dilución 1:1000 (Abcam 105053), Anti-S100 $\beta$  oligoclonal – rabbit/IgG en dilución 1:500 (ThermoFisher 710363). Las membranas correspondientes fueron incubadas con sus anticuerpos, todos diluidos en solución TBS-T 0,05% en bolsas plásticas selladas sin burbujas, incubándose durante 48 horas a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación se recuperó el anticuerpo primario y se almacenó a -20°C y las membranas se lavaron en TBS pH 7,5 a diferentes concentraciones: 1X, 0,1% y 0,05%.

Al incubar en una misma membrana de nitrocelulosa la proteína control de carga (Actina) y la proteína de interés (NSE), con pesos moleculares similares 42 y 48 kDa respectivamente, se decidió realizar la extracción del anticuerpo primario (Anti-ENO1 + ENO2 + ENO3) mediante stripping suave (Abcam®) (Anexo E) para luego incubar la membrana con el anticuerpo Anti- $\beta$ -Actin, en los lisados medulares.

**2.7.5** Incubación del anticuerpo secundario HRP. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron, Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) en dilución 1:5000 (Abcam 6789), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) 1:5000 (Abcam 6721). Ambos anticuerpos fueron incubados en las membranas correspondientes preparados en solución TBS-T 0,05% con BSA al 5% durante 90 minutos en un recipiente en movimiento a temperatura ambiente. Se recuperó el anticuerpo secundario y se almacenó a 4°C y se realizaron lavados.

**2.7.6** Detección. En una caja de Petri plástica se ubicó la membrana y se lavó en la solución de quimioluminiscencia, basada en la guía (Bio-rad) con adaptaciones propias del Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas de la Universidad del Tolima (sin publicar). Esta solución empleada para el proceso de revelado se preparó mezclando 200  $\mu$ L de Tris HCl 1M pH 8.5, 10  $\mu$ L de Luminol 250 mM (Sigma-Aldrich) y

4,4 uL de Ácido Cumárico 90 mM (Sigma-Aldrich), llevándose a volumen de 2 mL con agua desionizada. Justo antes de utilizarse, se adicionó 0,6 uL de peróxido de hidrógeno (PanReac) al 30%.

Las membranas se incubaron hasta visualizar la señal de las bandas de la proteína de interés. Se escurrió el exceso de solución de la membrana y esta se ubicó bajo el foco de la cámara. Se capturaron las imágenes a diferentes tiempos de exposición según la proteína: captura de imágenes para Anti  $\beta$ -actina (1 minuto) anti-ENO (1 minuto) anti-S100 $\beta$  (30 segundos) de exposición. Todo el procedimiento se realizó en penumbra con luz roja.

## **2.8 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO**

Se cuantificaron las bandas mediante un análisis densitométrico a la fotografía digitalizada de las bandas de proteína (Actina–ENO–S100 $\beta$ ) obtenidas en el inmunoblotting de cada muestra (segmentos medulares) y cada réplica comparando los dos grupos (experimental y control) mediante un sistema de análisis de imagen (Software ImageJ Fiji, 1.51 k.).

## **2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva unidimensional y fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media, definiéndose los análisis a partir del cumplimiento de los supuestos de las pruebas. Se realizó una prueba de *t* de Student así como de U de Mann-Whitney para los datos no paramétricos. Los grupos fueron además analizados agrupando los datos en dos columnas sin considerar el efecto del segmento medular (MA, MM, MP). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . El análisis de los datos se realizó a través del Programa Graph Pad PRISM, v.6.01 para Windows (La Jolla, CA).

### 3. MARCO TEÓRICO

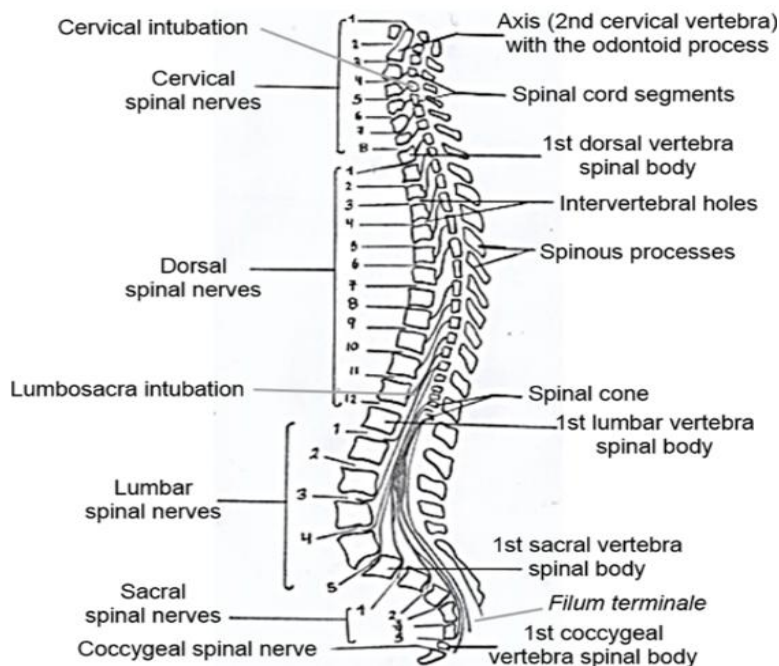
#### 3.1 ANATOMÍA MACROSCÓPICA DE LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal es la parte del Sistema Nervioso Central (SNC) ubicada en el canal vertebral, de forma cilíndrica y ligeramente aplanada con una longitud promedio de 40-42 cm y 1 cm de ancho en el ser humano; su diámetro no es uniforme, ya que presenta un engrosamiento o intumescencia en la parte cervical y otro a nivel lumbosacro (Ojeda & Icardo, 2004). Por su extremo craneal, se continúa con la médula oblonga y en su extremo caudal termina a la altura de L2 en forma de cono invertido o cono medular, el cual posee una prolongación atrofiada denominada *filum terminal*, que se inserta en el borde posterior del cóccix (Ojeda & Icardo, 2004; Rodrigo, 2002).

De la médula espinal, en los seres humanos, emergen 31 pares de nervios espinales, que se originan de una raíz anterior o ventral y una posterior o dorsal; esta última, presenta un engrosamiento cerca de su origen, que corresponde al ganglio espinal. Estas raíces se forman por la confluencia de fibras radicales que se fusionan cuando salen del canal vertebral a través de los agujeros conjugados, conformando cada uno de los nervios espinales. Dependiendo de la región medular de la cual emergen cada par de nervios espinales, se designa un segmento medular, existiendo tanto segmentos como vértebras (Ojeda & Icardo, 2004), excepto el segmento C1 que no tiene raíces dorsales, por lo tanto su nervio espinal emerge entre el hueso occipital y la primera vértebra cervical (Díaz & Morales, 2016).

La médula espinal se compone de 8 segmentos cervicales, 12 torácicos o dorsales, 5 lumbares, 5 sacros y 1 cóccigeo; sin embargo, los niveles de la médula espinal y la columna vertebral no se corresponden debido a sus diferencias en las tasas de crecimiento durante el desarrollo embrionario (Bican et al., 2013).

**Figura 4.** Organización longitudinal de la médula espinal (segmentos cervical, torácico y lumbar), vértebras espinales y nervios espinales.



Fuente: Adaptado de World Health Organization (2013)

### 3.2 ESTRUCTURA DE LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal está compuesta por un centro interior de sustancia gris rodeado por una cobertura exterior de sustancia blanca (Snell, 2007).

**3.2.1 Sustancia gris.** Tiene forma de “H” conformando sus ramas verticales las astas anteriores y posteriores; las astas anteriores son las más voluminosas, con una región intermedia muy desarrollada en los segmentos torácicos que forman el asta lateral (Ojeda & Icardo, 2004; Snell, 2007). De las astas anteriores y posteriores, emergen las raíces anteriores que llevan información motora y las raíces posteriores que llevan información sensorial a través de los nervios espinales (Díaz & Morales, 2016). Las astas anteriores y posteriores están unidas por una delgada comisura gris que contienen el conducto central o canal del epéndimo (Snell, 2007).

En la sustancia gris se encuentran los somas o cuerpos neuronales, sus prolongaciones dendríticas, la neuroglia (astrocitos, endotelios y microglía) y abundantes vasos sanguíneos que le confieren una coloración gris rosácea. Los diferentes tipos neuronales se organizan en núcleos o columnas más o menos continuas a lo largo de toda la médula de la siguiente manera:

- En el asta anterior, según el segmento, se ubican de 5 a 6 columnas, formadas por motoneuronas que inervan el tronco y las extremidades
- En el asta posterior, se ubica la sustancia gelatinosa de Rolando, en el vértice del asta, y el núcleo sensitivo propio cerca de la base del asta
- En la región intermedia, existen 3 núcleos que no se extienden a lo largo de toda la médula, la columna intermediolateral entre T1 y L1 que forman el asta lateral compuesta de neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo simpático; el núcleo parasimpático sacro, entre S2 y S4 compuesto por neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo parasimpático y la columna torácica o núcleo torácico de Stilling-Clarke, entre C7 y L2 próximo a la base del asta posterior. (Ojeda & Icardo, 2004).

Además, la sustancia gris de la médula espinal, se divide en las láminas de Rexed, que se extienden a lo largo de toda la médula, modificando su forma y extensión, en el asta posterior (láminas de I a VI), región intermedia (lamina VII), asta anterior (una parte de la lámina VII, VIII y IX fragmentada), y en la comisura gris (lámina X) (Ojeda & Icardo, 2004).

**3.2.2 Sustancia blanca.** Se divide en columnas o cordones anteriores, laterales y posteriores. La columna anterior, se ubica entre la línea media y la salida de las raíces nerviosas anteriores, la columna lateral se halla entre la salida de las raíces nerviosas anteriores y la entrada de las raíces nerviosas posteriores y la columna posterior se ubica entre la entrada de las raíces nerviosas posteriores y la línea media. (Snell, 2007). La sustancia blanca corresponde a las zonas del SNC que consta de fibras nerviosas axonales, neuroglia y vasos sanguíneos, rodea la sustancia gris y su color blanquecino



se debe a que existe un predominio de axones mielinizados (Ojeda & Icardo, 2004; Snell, 2007).

### **3.3 TRACTOS DE LA MÉDULA ESPINAL**

**3.3.1** Tractos ascendentes de la médula espinal. Al ingresar en la médula espinal las fibras nerviosas sensitivas, se distribuyen en tractos. Algunas fibras sirven para vincular diferentes segmentos de la médula espinal, mientras que otras ascienden desde la médula conectándola con el encéfalo, denominadas tractos ascendentes, los cuales conducen información aferente que puede llegar al encéfalo (Snell, 2007). Esta información puede originarse fuera del cuerpo, exteroceptiva (dolor, temperatura, tacto) o dentro del cuerpo, propioceptiva (músculos y articulaciones) y es conducida a través del SNC por una serie de neuronas específicas (Rodrigo, 2002).

Los tractos ascendentes más relevantes, son los tractos espinotalámicos anterolaterales y la columna blanca posterior; siendo las fibras directas de esta última, una de las mayores vías ascendentes (Díaz & Morales, 2016). Esta vía, se compone de fibras ascendentes largas que se dirigen hacia arriba como el fascículo grácil y el fascículo cuneiforme. El fascículo grácil está presente en toda la longitud de la médula y contiene fibras de los nervios espinales sacros, lumbares y los seis torácicos inferiores, mientras que el fascículo cuneiforme está situado lateralmente en los segmentos torácicos superiores y todos los segmentos cervicales de la médula. Las fibras de ambos fascículos ascienden ipsilateralmente y establecen sinapsis con las neuronas de segundo orden en el núcleo grácil y el núcleo cuneiforme del bulbo raquídeo (Gruener & Biller, 2008).

Las vías decusantes postsinápticas (fibras arcuatas internas) ascienden como lemnisco medial estableciendo sinapsis con las neuronas de tercer orden en el núcleo ventroposterolateral del tálamo. La columna blanca posterior transmite información propioceptiva, táctil y sensibilidad vibratoria desde el lado ipsilateral del cuerpo (Díaz & Morales, 2016; Snell, 2007).

Las vías de dolor central se denominan sistema anterolateral y contienen múltiples fibras ascendentes siendo el tracto espinotalámico (SPT) el más importante (Díaz & Morales, 2016). El tracto SPT, está compuesto por el tracto espinotalámico ventral o anterior que transmite información relacionado con el tacto crudo (se relaciona cuando el individuo sabe que ha sido tocado pero es incapaz de localizar un punto exacto) y la presión firme y el tracto espinotalámico lateral que transmite información relacionada con la temperatura y el dolor (Rea, 2015).

Este se origina en el asta posterior contralateral y se divide en fibras ascendentes y descendentes, que recorren uno o dos segmentos de la médula y forman el tracto posterolateral de Lissauer, en donde las neuronas de primer orden establecen sinapsis con células de la columna gris posterior (sustancia gelatinosa), después los axones de las neuronas de segundo orden cruzan en dirección oblicua hacia el lado opuesto en las comisuras gris y blanca anteriores dentro de un segmento medular y ascienden terminando en el núcleo ventroposterolateral del tálamo (Rea, 2015).

Entre otras vías ascendentes se encuentran:

- Tracto espinocerebeloso: se extiende a través de las áreas periféricas dorsales, laterales y ventrales de la sustancia blanca. El tracto espinocerebeloso dorsal o posterior, transmite información desde la parte caudal del cuerpo y las piernas, aunque su núcleo asociado (núcleo de Clarke) recibe información de todas las partes del cuerpo de C8 a L2. La información se refiere tanto a los músculos individuales como a grupos de ellos, denominada propiocepción no consciente y permite que el cerebelo coordine la postura y el movimiento de la musculatura de las extremidades inferiores. El tracto espinocerebeloso ventral o anterior transmite información que surge de los órganos del tendón de Golgi en la unión entre el tendón y el músculo de los miembros inferiores, transmitiendo información de todo el miembro y ajustes de la postura. Por su parte, el tracto espinocerebeloso rostral transmite información sobre los miembros superiores de los órganos del tendón de Golgi.
- Tracto cuneocerebeloso: transmite información relacionada con los miembros superiores, información no propioceptiva no consciente de los husos musculares y de

los órganos del tendón de Golgi de la musculatura de la extremidad superior (Rea, 2015)

- Tracto espinotectal: transmite información aferente para los reflejos espinovisuales y provoca movimiento de los ojos y la cabeza hacia la fuente del estímulo
- Tracto espinorreticular: proporciona una vía aferente para la formación reticular, importante en los niveles de conciencia
- Tracto espinoolivario: transmite información al cerebelo desde los órganos cutáneos y propioceptivos
- Tractos sensitivos viscerales: transmite sensaciones de las vísceras ubicadas en el tórax y abdomen (dolor y estiramiento en las vísceras).

**3.3.2** Tractos descendentes de la médula espinal. Las neuronas motoras en las columnas grises anteriores envían axones que inervan el músculo esquelético a través de las raíces anteriores, estas neuronas se denominan neuronas motoras inferiores, que reciben impulsos nerviosos que descienden desde el bulbo raquídeo, la protuberancia, el mesencéfalo y la corteza cerebral como también los que ingresan por medio de las fibras sensitivas. Las fibras nerviosas que descienden en la sustancia blanca desde diferentes nervios supraespinales, se organizan en tractos descendentes, conformado por neuronas motoras superiores que dan origen a diferentes vías, las cuales influyen en la actividad motora (Snell, 2007).

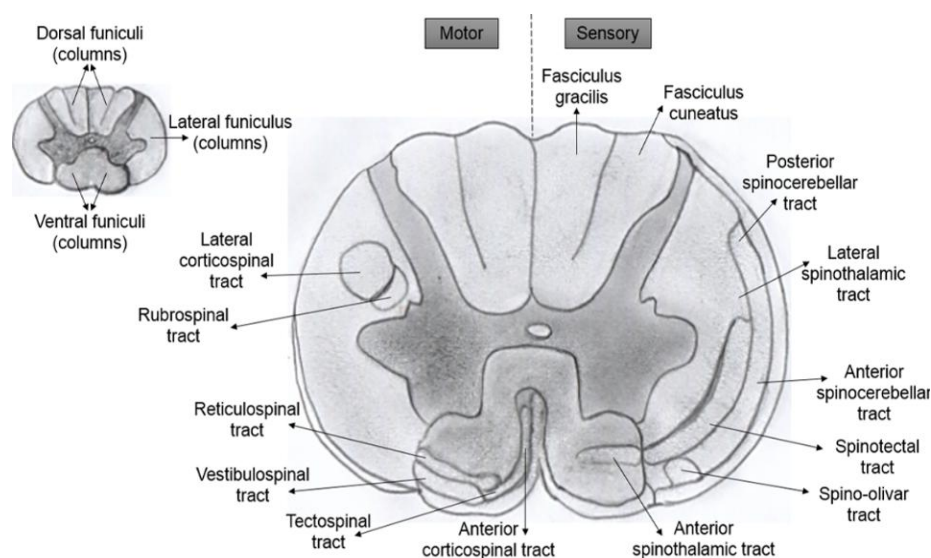
Las fibras del tracto corticoespinal, que surgen como axones de las células piramidales situadas en la quinta capa de la corteza cerebral, son el mayor y más significativo tracto descendente de la médula espinal. Casi el 90% de sus fibras decusan en la médula inferior para formar el tracto corticoespinal lateral, mientras que hay un 8% de fibras no decusadas que forman el tracto corticoespinal anterior aunque finalmente cruzan la línea media y terminan en la columna gris anterior en la región cervical y torácica superior, y un 2% también de fibras no decusadas que descienden por toda la longitud de la médula y forman el tracto corticoespinal lateral.

Las fibras del tracto corticoespinal anterior proporcionan entrada sináptica a neuronas responsables del control de movimientos voluntarios hábiles y rápidos, especialmente de los extremos distales. También hay fibras que se proyectan hacia la columna gris posterior y actúan como moduladores de la información aferente sensorial, para procesar estímulos de dolor selectivamente (Bican et al., 2013; Snell, 2007).

Entre otras vías descendentes se encuentran:

- Tracto reticuloespinal: a través de las neuronas internunciales compartidas con el tracto corticoespinal, actúan sobre las neuronas motoras de los músculos de las extremidades axial y proximal, implicados en la locomoción y postura
- Tracto tectoespinal: surge del tectum del tallo cerebral y orienta la cabeza a la estimulación visual o auditiva (Gruener & Biller, 2008)
- Tracto rubroespinal: actúa sobre las neuronas motoras facilitando la actividad de los músculos flexores e inhibe la actividad de los músculos extensores
- Tracto vestibuloespinal: actúa sobre las neuronas motoras facilitando la actividad de los músculos extensores e inhibe la actividad de los músculos flexores y se vincula con la actividad postural asociada con el equilibrio.

**Figura 5.** Tractos de la médula espinal.



Fuente: Adaptado de Elizalde (2016)

Sin embargo, también se ha demostrado que existen fibras autónomas descendentes que probablemente forman parte del tracto reticuloespinal. Las fibras cruzan la línea media del tronco del encéfalo, descienden en la columna blanca lateral y establecen sinapsis con células motoras autónomas en las columnas grises laterales a nivel torácico y lumbar superior (eferencia simpática) y mediosacro (parasimpática) (Snell, 2007).

### **3.4 VASCULARIZACIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL**

**3.4.1 Sistema arterial.** La médula espinal se compone de tres familias de arterias, vasos orientados longitudinalmente que se extienden en una dirección craneal-caudal desde el cordón cervical superior hasta el cono medular, vasos afluentes radicales que se alimentan en vasos longitudinales a través de múltiples segmentos espinales y numerosas arterias alimentadoras (intrínsecas) que entran en el parénquima (Grotta et al., 2015). Un vasto plexo vascular surge de las anastomosis entre estos vasos a lo largo de la superficie de la médula espinal y de la cual los vasos medulares penetran tanto en la sustancia blanca como gris. Estos vasos penetrantes son arterias terminales y no se anastomosan más.

La arteria espinal anterior surge de la unión de las ramas espinales anteriores de la arteria vertebral y desciende dentro de la fisura media anterior de la médula espinal hasta el cono medular (Gruener & Biller, 2008).

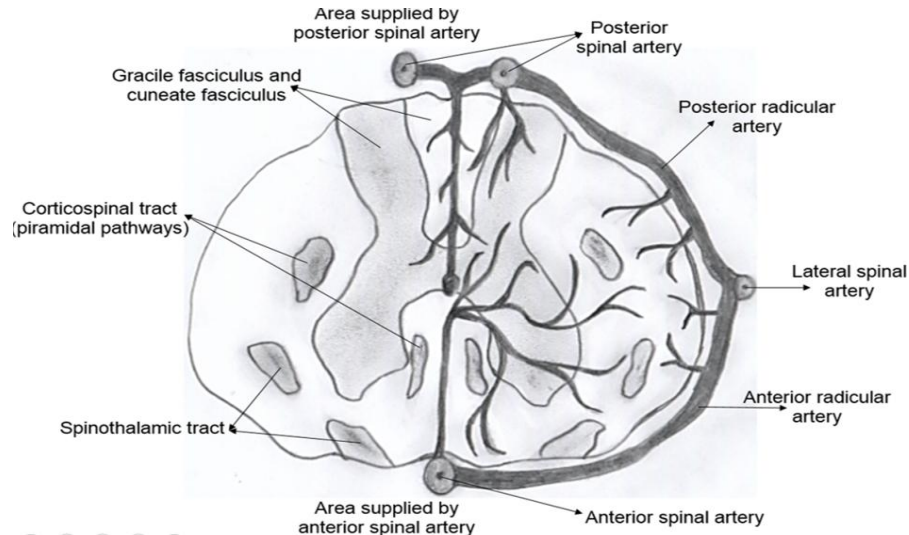
La arteria espinal posterior, es una rama inconstante, par y delgada, que se origina directamente de la arteria vertebral o en la arteria cerebelosa inferoposterior. Estas arterias recorren longitudinalmente la cara posterior de la médula espinal por fuera de la línea media y a lo largo de su recorrido, desprenden ramas que penetran la médula para abastecer las columnas posteriores, la sustancia gris y las columnas laterales.

Existen 31 pares de ramas espinales que penetran el conducto raquídeo a través de los agujeros intervertebrales y se dividen en una rama anterior y otra posterior (ramas radicales) que acompañan las dos raíces de cada nervio raquídeo. Estas ramas radicales se dividen en forma de “T”, originando una rama ascendente y otra descendente, que se unen a las ramas de división superior e inferior de las espinales contiguas, originando un sistema arterial longitudinal en el plano anterior y otro en el

posterior. Las ramas radiculares anteriores más importantes por su volumen y constancia son las que alcanzan los últimos segmentos cervicales (C5 y C6) y la gran arteria espinal anterior (de T9 a L1).

Todas las arterias de la médula espinal establecen entre si numerosas anastomosis, formando un plexo vascular en el espacio subaracnoideo. De este plexo salen las arterias intramedulares que irrigan la sustancia gris y blanca, siendo mayor la irrigación a nivel de las intumescencias medulares (Grotta et al., 2015; Ojeda & Icardo, 2004).

**Figura 6.** Vascularización de la médula espinal.



Fuente: Tomado de Lee & Thumbikat (2015)

**3.4.2 Sistema venoso.** Las grandes venas centrales anteriores y posteriores recogen la sangre de ambos lados de la médula espinal que acompaña a las arterias que entran. La vena central posterior no tiene contrapartida arterial y drena en una zona posterior la vena longitudinal media. Entre las venas centrales anterior y posterior hay una anastomosis central que rodea el canal vertebral. Las venas radiales se unen al plexo pial venoso alrededor de la circunferencia de la médula espinal. Desde las venas longitudinales anteriores y posteriores, la sangre drena hacia las venas radiculares

anteriores y posteriores paralelas y adyacentes a la raíz nerviosa (Mautes, Weinzierl, Donovan, & Noble, 2000).

### **3.5 LESIÓN MEDULAR (LM)**

La lesión medular es un proceso patológico de cualquier etiología, que afecta a la médula espinal y puede originar alteraciones neurológicas (motoras, sensitivas y autonómicas) por debajo del nivel de la lesión, generando consecuencias psicosociales para la persona y su familia, con procesos de discapacidad (Henao & Murua, 2015). Esta lesión se puede clasificar según su etiología en causas médicas como enfermedades congénitas (espina bífida o mielomeningocele) y/o alteraciones secundarias a enfermedades médicas (infecciones, enfermedades inflamatorias, lesiones vasculares y tumores) y causas traumáticas que son la lesión medular más frecuente (Forner, 2011).

**3.5.1 Historia.** La evidencia más antigua en relación a la lesión medular es un papiro de Edwin Smith (2600-2200 a.C.) (Acevedo, Varón, Berbeo, Feo & Díaz, 2008). En él se recogen 48 casos de heridas, patologías y fracturas, siendo seis los casos que se refieren a lesiones de la médula espinal, describiendo rigidez de cuello, dolor y/o imposibilidad de rotación y flexión de cuello como los signos más significativos y diagnosticándose como un aplastamiento de una vértebra en el cuello, sin sentir brazos y piernas y sin poder hablar (Murua, 2015).

En el año 460 a.C, nació el padre de la medicina y la ortopedia, Hipócrates, (Forner, 2011) médico de la antigua Grecia, quien describió que las lesiones medulares que producían parálisis no tenían opciones de tratamiento y esos pacientes estaban destinados a morir y para tratar las fracturas de la columna que no resultaban en parálisis, Hipócrates utilizó dos formas rudimentarias de tracción conocidas como la escalera hipocrática (hippocratic ladder) y el banco hipocrático (hippocratic board) (Acevedo et al., 2008).

En el siglo II (130-200 d.C.), nació en Pérgamo quien pasaría a la historia como el prototipo de médico, Galeno, que contribuyó al conocimiento de la mayoría de la fisiología medular, identificando el número de vértebras, describiendo los 29 pares de nervios espinales, distinguiendo entre las raíces de la sensibilidad y de la motilidad, detallando la distribución segmental de los nervios, el plexo braquial y lumbosacro y efectuó las primeras lesiones medulares experimentales en cerdos.

En lo referente al tratamiento de las lesiones de la columna y de la médula espinal, destacaron: Pablo de Aegina (625-690 d.C), quién propuso a pacientes con fractura y parálisis, la primera intervención quirúrgica para reparar las lesiones de la médula espinal, anunciando la laminectomía descompresiva, Ambrosio Paré (1510- 1590), considerado la principal figura quirúrgica del siglo XVI, en su obra Diez libros de la Cirugía, aconsejaba la tracción y presión sobre el cuello, de acuerdo con el método de Hipócrates, aunque perfeccionando su banco de tracción suspendiendo al paciente con los miembros superiores fijos y sus piernas colgadas libremente y puntualizaba la peligrosidad de la maniobra.

Durante el Renacimiento se produjeron los primeros intentos de entender la biomecánica espinal. Leonardo da Vinci (1452-1519) describió las correctas curvaturas de la columna y sus diversas articulaciones y fue, posiblemente, el primero en investigar la estabilidad de la columna, sugiriendo que provenía, en parte, de la musculatura cervical. Sin embargo, es a Borelli (1608-1679) a quien se le considera el padre de la biomecánica espinal, tras publicar en 1680 el Tratado de Biomecánica.

En el siglo XVIII, se presentaron dos casos exitosos de intervenciones quirúrgicas (1753 y 1762) en pacientes con paraplejía, con recuperación de la movilidad en miembros inferiores. Esto proporcionó un gran auge a la cirugía de la columna. La primera laminectomía con buena recuperación en Estados Unidos se llevó a cabo en 1829, en la columna lumbar, en un paciente que presentaba una paresia progresiva tras una fractura vertebral.



Los progresos de la cirugía de columna arrancaron con la mejora de la asepsia, la anestesia general y la realización de abundantes autopsias, impulsadas en el siglo XIX. El gran impulso en el tratamiento de las lesiones medulares, se desarrolló durante la Segunda Guerra Mundial, al incrementarse el número de lesionados. Esto, obligó a la organización de centros de atención específicos para lesionados medulares.

Se inauguraron Unidades Medulares especializadas en diferentes partes del mundo, lideradas en Estados Unidos por el Dr. Donald Munro y en Inglaterra por el Dr. Ludwig Guttmann, de origen alemán. El tratamiento en estas unidades, se centraba en los mecanismos fisiopatológicos y en la terapia de la lesión medular en la fase aguda y crónica. Logrando disminuir la extensión de la lesión, las complicaciones como las úlceras por presión, la tasa de mortalidad y la estancia hospitalaria mejoró la calidad y expectativa de vida (Forner, 2011).

El Dr. Ludwig Guttmann (1899-1980), es considerado por algunos como el fundador del tratamiento moderno de lesiones medulares y desde el Centro Nacional de Lesionados Medulares del Hospital de Stoke-Mandeville en Aylesbury (Reino Unido), abierto el 1 de febrero de 1944, revolucionó la asistencia al lesionado medular en menos de dos años y difundió sus ideas por toda Europa, considerándose maestro de muchos especialistas en el mundo. Además, reconoció la importancia de la fisioterapia y la incorporación de ejercicio en los primeros estadios de la lesión para su rehabilitación (Forner, 2011; Murua Arabaolaza, 2015).

La primera Unidad de Lesionados Medulares dentro del marco de la Seguridad Social fue el de la Ciudad Sanitaria Virgen de Covadonga de Oviedo en 1963, dirigida por el Dr. Álvarez-Buylla. El Instituto Guttmann, inaugurado en 1965 en Barcelona, surgió como el primer hospital autónomo en España especializado en paraplejia y tetraplejia, gracias a la ayuda financiera de la Asociación Nacional de Inválidos Civiles. Su promotor fue el Sr. González-Gilbert, paciente tetrapléjico tratado en el Hospital de Stoke Mandeville.

En 1974, los entonces Príncipes de España inauguraron el Centro Nacional de Paraplégicos de Toledo, primer hospital público de referencia en España y centro monográfico dedicado al tratamiento y la rehabilitación de la lesión medular, desde el momento del accidente hasta su completa integración social y profesional, siendo su primer director médico el Dr. J.V. Forner Valero, discípulo directo del Dr. Guttmann en el Hospital de Stoke-Mandeville y que participó desde el inicio en el proyecto para impulsar, organizar y poner en marcha la iniciativa.

Desde entonces se han abierto otras Unidades de Lesionados Medulares por varias capitales españolas, dentro de los Servicios de Rehabilitación de grandes hospitales y siendo atendidas por médicos rehabilitadores seguidores de las ideas de Guttmann (Forner, 2011)

**3.5.2 Datos epidemiológicos.** La lesión medular no es tan común como muchas otras lesiones, pero sus consecuencias físicas y psicosociales son devastadoras. La lesión de la médula espinal, ya sea traumática o no traumática, y las discapacidades que siguen son de gran preocupación para el mundo médico, la persona afectada, su familia y la sociedad en su conjunto. Muy pocas personas experimentan recuperación neurológica completa después de la LM. Una proporción significativa resulta en déficits neurológicamente completos y tetraplégicos, produciendo efectos a largo plazo que persisten a lo largo de toda la vida. Los costos de por vida de la LM y las condiciones secundarias relacionadas representan una carga significativa, por lo tanto los datos epidemiológicos son de fundamental importancia para determinar su ocurrencia, decidir estrategias preventivas y planificar recursos clínicos y sociales (Van Den Berg, Castellote, Mahillo & De Pedro-Cuesta, 2010; Yuying, Ying, Vogel, & DeVivo, 2013).

Cuando se manejan estadísticas referidas a enfermedades, hay dos aspectos diferentes que resultan muy relevantes: el número de nuevos casos surgidos (normalmente referidos al periodo de un año, denominados incidencia) y el número de casos existentes entre la población (normalmente referidos como casos/millón de habitantes, denominados prevalencia).

Aunque varios estudios han intentado cuantificar la prevalencia e incidencia en todo el mundo, varias cuestiones han impedido una estimación precisa. No existe un método normalizado de evaluación entre regiones, las estimaciones de algunos países se han extrapolado de las cifras obtenidas en las zonas urbanas o rurales y, por lo tanto, pueden no ser totalmente representativa, una gran proporción de los datos de prevalencia mundial proviene de países desarrollados como España y los Estados Unidos de América, con información limitada de los continentes en desarrollo, incluyendo África, América del Sur y Asia y dado que existe una tasa de mortalidad tan elevada en la escena del accidente y durante la recuperación y el transporte del paciente, muchos estudios han subestimado cifras.

**3.5.2.1 Prevalencia.** El rango de prevalencia global de la LM se encuentra aproximadamente entre 236 y 1.009 casos por millón de habitantes, presentando Estados Unidos las mayores cifras (906 casos por millón), mientras que países como Francia y Finlandia se sitúan en niveles muy inferiores (250 y 280 casos por millón, respectivamente) (Singh, Tetreault, Kalsi, Nouri, & Fehlings, 2014).

En Colombia, un estudio realizado en el hospital Universitario de La Samaritana de tercer nivel de Bogotá, reportó que durante los años 2010-2014 se presentaron en total 174 casos de pacientes atendidos (Teherán, Castro, & Frade, 2017).

**3.5.2.2 Incidencia.** Estados Unidos presenta la incidencia más alta a nivel mundial. Se producen entre 12.000 y 14.000 nuevas lesiones por año (Forner, 2011), estimándose entre 30 y 40 casos por millón de habitantes; sin embargo, este número de incidencia incluye el 8,5% de los casos de origen desconocido, que podrían deberse a etiologías no traumáticas como tumores e infecciones (Jazayeri, Beygi, Shokraneh, Hagen, & Rahimi, 2015). Se calcula que cerca de 4.000 afectados por LM mueren antes de llegar al hospital y el 5% durante la primera semana de hospitalización. Contabilizando estas víctimas se alcanzarían los 43 y 55 casos por millón de habitantes (Forner, 2011).

La tasa de incidencia de LM en los Estados Unidos es similar a la de Canadá (35 casos por millón), pero es consideradamente mayor que las cifras reportadas en Europa Occidental (16 casos por millón) y Australia (15 casos por millón). Además de las diferencias en la metodología, las características de la población y las tasas de mortalidad prehospitalaria, el aumento de la incidencia de LM en América del Norte parece estar asociado a un mayor porcentaje de lesiones medulares relacionadas con la violencia (18%) en comparación con Europa occidental (8%) y Australia (2%) (Yuying et al., 2013).

En América Latina se tienen muy pocos datos, los cuales provienen principalmente de Sao Paulo y se extrapolan al resto del continente. Brasil es el único país de Latinoamérica que presenta información útil para estimar la incidencia del trauma, determinando la carencia de estudios en Latinoamérica y la necesidad de realizar investigaciones que permitan estimar el verdadero riesgo de la población (Teherán et al., 2017).

En Brasil, la incidencia de lesión medular traumática es de 17,3 casos por millón de habitantes, basada únicamente en encuestas retrospectivas, pudiendo subestimarse en un país con más de 200 millones de habitantes en el cual se aprecia una creciente preocupación por los accidentes de tránsito (Jazayeri et al., 2015).

En Colombia, se ha reportado que la LM se presenta en 1 de cada 40 pacientes colombianos que ingresan a un hospital general consultando por trauma (Henao & Pérez, 2010). Aunque la incidencia de trauma raquimedular (TRM) en Colombia no ha sido ampliamente estudiada, en solo una investigación realizada en el Hospital Pablo Tobón Uribe de Medellín, se reportó una incidencia de 12 casos por 1.000 pacientes (Silva et al., 2016).

**3.5.2.3 Etiología.** En cuanto a las lesiones medulares traumáticas, tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo, las causas principales son los accidentes de vehículo y las caídas; sin embargo, en algunos de ellos, la violencia es una de las principales causas.

Dentro de los accidentes con vehículo, que representan la primera causa de lesión medular traumática con un 39,1%, los automóviles suponen un 27,6% del total. La segunda causa de lesión medular traumática, con un 28,6%, son las caídas accidentales. Dentro de éstas, la primera causa de todas, con un 5,3%, son las caídas en un mismo nivel (resbalarse, tropezarse). La tercera causa, con un 15,3%, es la violencia. Las heridas por disparo de arma representan un 13,8% de los casos. Las de contacto físico representan un 1,%, y un 0,4% son debidas a otro tipo de heridas penetrantes, tales como apuñalamiento (Murua, 2015).

La etiología más frecuentes de LM en EE.UU. incluye los accidentes automovilísticos (31,5%), caídas (25,3%), heridas de bala (10,4%), accidentes de motocicleta (6,8%), incidentes de buceo (4,7%) y complicaciones médico/quirúrgicas (4,3 %) (Yuying et al., 2013).

En Colombia, no se conocen estudios que reporten los datos epidemiológicos de lesión medular. El Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses estableció que en el año 2005 los accidentes de tránsito habían sido responsables de cerca de 1.036 traumas en las regiones del cuello y del área pélvica, representando el 2,99% de las personas que presentaron traumatismos en accidentes de tránsito en el país. La lesión medular se ha reportado como uno de los motivos de consulta más frecuentes en los centros de atención de salud de todos los niveles de complejidad como consecuencia del estado de violencia que vive el país, sin que sus datos sean oportunamente publicados.

Los traumatismos constituyen cerca del 80% de los casos de lesión medular en países en vía de desarrollo como Colombia, los traumas son ocasionados con mayor frecuencia por heridas con arma blanca o de fuego (20-60%), seguida por accidentes automovilísticos (15%) y caídas (14%) (Henao & Pérez, 2010).

En la investigación realizada en el Hospital Pablo Tobón Uribe, las lesiones violentas por arma de fuego, fueron la principal causa de TRM (57%) seguido por accidentes de tránsito (32%) (Carvajal et al., 2015).

**3.5.2.4 Edad.** La distribución de edad es bimodal con el primer pico más grande entre los 15 y 29 años de edad y un segundo pico que ocurre a edades mayores de 65 años. La edad media en lesión ha aumentado de 28 años en la década de 1970 a 37 años entre 2005 y 2008 (Witiw & Fehlings, 2015).

En Estados Unidos la edad más común de lesión es entre 16 y 30 años (38,5%), seguido por los grupos etáreos de 31 a 45 años y de 46 a 60 años (21% y 21,5%, respectivamente); sin embargo, el perfil de etiología varía según la edad. Los choques automovilísticos fueron la principal causa de LM hasta los 45 años, mientras que las caídas fueron la causa principal después de los 45 años de edad. De hecho, las caídas representaron alrededor del 75% de todas las LM en personas de 76 años de edad y mayores. Las heridas por arma de fuego fueron la segunda causa principal de LM en personas de 16 a 30 años (19%) y la tercera causa más frecuente en niños menores de 15 años (8,1%). Los accidentes de motocicletas ocupan el tercer lugar entre las personas de 31 a 45 años y entre 46 y 60 años de edad (10,9% y 7,1%, respectivamente). Las complicaciones médico-quirúrgicas fueron la segunda causa principal de LM en niños menores de 16 años (12,8%) y la tercera causa principal en personas mayores de 60 años (10,9%) (Yuying et al., 2013).

En Medellín (Colombia), se reportó una serie de casos de LM en personas con un promedio de edad de 32 años, mientras que en un estudio realizado en Bogotá se reportó en personas de 35 años en promedio (Henao & Pérez, 2010).

**3.5.2.5 Género.** La LM ocurre de 3 a 4 veces más frecuentemente en hombres que en mujeres (Witiw & Fehlings, 2015). La incidencia de lesión medular en hombres respecto a las mujeres es mayor en todos los estudios recogidos por *Global Incidence & Prevalence*, siendo la relación hombre/mujer favorable para la mujer por su baja incidencia (Murua, 2015).

En Estados Unidos, en general, el 78,5% de todas las LM informadas ocurren entre los hombres. Las dos primeras causas principales, choques automovilísticos y caídas,

representan colectivamente el 53,5% de todas las LM en hombres y 68,6% en mujeres. Las heridas por arma de fuego, los choques de motocicletas e incidentes de buceo causaron más LM en los hombres que en las mujeres (11,7% vs 5,8%, 8% vs 2,4% y 5,3% vs 2,4%, respectivamente). Por el contrario, las complicaciones médico/quirúrgicas ocuparon el sexto puesto en los varones, pero fueron la tercera causa principal para las mujeres (3,3% frente a 7,6%) (Yuying et al., 2013).

Se desconocen datos estadísticos para toda Colombia, sin embargo, en la investigación realizada en pacientes con TRM admitidos en el Hospital de San Vicente Paúl de Medellín entre septiembre de 1999 y diciembre de 2001, se encontró una proporción de 86% de hombres contra un 14% de mujeres (Henao & Pérez, 2010).

En el hospital Universitario de La Samaritana en Bogotá, el perfil sociodemográfico de los pacientes que sufrieron TRM fue de hombres, adultos-jóvenes, con parejas estables y provenientes de la región de Cundinamarca, encerrando características del perfil del trabajador rural colombiano (Teherán et al., 2017), similar a los resultados de un estudio realizado en el año 2005 en Bogotá, en donde aproximadamente el 76% de las personas afectadas fueron hombres (Silva et al., 2016).

**3.5.2.6 Gravedad y nivel.** Respecto a la amplitud de la lesión medular, en los países en desarrollo más de la mitad (56,5%) corresponden a lesiones completas, siendo las incompletas el 43,5% respectivamente. En los países desarrollados, sin embargo, se dan con más frecuencia lesiones medulares incompletas, dentro de ellas son las tetraplejias las más comunes. Dentro de las lesiones medulares completas la paraplejia es más común que la tetraplejia, tetraplejia incompleta (45%), paraplejia incompleta (21%), paraplejia completa (20%) y tetraplejia completa (14%) (Murua, 2015).

La mayoría de las lesiones reportadas en las distintas investigaciones a nivel mundial se ubican en los niveles cervical, entre el 34 y 53% de los casos y, torácico entre el 43 y 48%, en tanto las lesiones lumbosacras van del 10 a 14% (Henao & Pérez, 2010).

En Estados Unidos el nivel y la integridad de la lesión están asociados con la etiología de la misma. Las heridas de bala y las complicaciones médico-quirúrgicas resultan en paraplejia, especialmente T7-S3 (45,9% y 43,7%, respectivamente). La lesión por buceo casi siempre resulta en tetraplejia (44,0% C1-C4 y 52,4% C5-C8). Un número sustancial de caídas y complicaciones médico/quirúrgicas resultan en lesiones motoras incompletas o grado D (39,7% y 40,8%, respectivamente). La mayoría de heridas de bala y accidentes de motocicleta resultan en una lesión completa (64,6% y 51,8%, respectivamente) (Yuying et al., 2013).

En el Hospital Universitario de San Vicente Paúl de Medellín, se encontró que el nivel más frecuente de lesión fue el cervical (47%) y torácico (47%) seguido por lumbar (6%) (Carvajal et al., 2015). Mientras que en el Hospital Universitario de La Samaritana en Bogotá aproximadamente la mitad de pacientes presentaron compromiso a nivel lumbar, constituyendo la principal lesión encontrada, contrario a lo identificado en la mayoría de estudios de ámbito local e internacional, donde el nivel cervical ocupa el primer lugar (Teherán et al., 2017).

**3.5.2.7 Costos.** Las agencias *Agency for Healthcare Research and Quality* y *Agency for health Care Policy and Research*, publicaron que la asistencia durante la fase aguda de la LM es el tratamiento más costoso en los Estados Unidos, con gastos que ascienden a 56.800 dólares para una media de hospitalización de 16 días. Otros estudios estiman una media de 95.000 dólares por año y por persona durante los dos primeros años tras la LM, solamente en gastos médicos y una media del coste de vida para un individuo de 25 años, con una tetraplejia alta, de 3.160.137 dólares, sin incluir la pérdida de productividad, salarios u otros costes indirectos, que varían según la severidad de la lesión, el nivel de estudios o la categoría profesional (Forner, 2011).

**3.5.3 Clasificación de la lesión medular.** Según la Asociación americana de lesión medular (ASIA), sigla del inglés *American Spinal Injury Association*, los estándares internacionales para la clasificación neurológica y funcional de la LM describen tanto el nivel como el grado de la lesión, basándose en una exploración de la función motora y



sensitiva. Esta clasificación se realiza de acuerdo con lo establecido por la ASIA y la Asociación internacional de médula espinal (Galeiras, Ferreiro, Mourelo, Montoto & Salvador de la Barrera, 2017; Strassburguer, Hernández, & Barquín, 2004).

Según la escala de discapacidad ASIA, la lesión medular se clasifica en 5 grados:

Lesión completa (A): ausencia de la función motora y sensitiva que se extiende hasta los segmentos sacros S4–S5 (preservación de tacto ligero o dolor en S4–S5, sensación anal profunda o contracción del esfínter anal)

Lesión incompleta sensitiva (B): preservación de la función sensitiva que se extiende hasta los segmentos sacros S4–S5 y con ausencia de función motora

Lesión incompleta motora C: preservación de la función motora por debajo del nivel neurológico y más de la mitad de los músculos por debajo del nivel tienen un balance muscular menor de 3 (de 0 a 5)

Lesión incompleta motora (D): preservación de la función motora por debajo del nivel neurológico y al menos la mitad de los músculos por debajo del nivel neurológico tienen un balance muscular mayor o igual a 3 (de 0 a 5)

Normal E: las funciones motoras y sensitivas son normales en todos los segmentos (Galeiras et al., 2017).

**3.5.4 Síndromes medulares.** Las lesiones medulares incompletas se pueden clasificar en diferentes síndromes según su anatomía funcional y mecanismo de lesión (Lee & Thumbikat, 2015). Entre estos síndromes se puede encontrar el Síndrome de Brown-Séquard o Hemisección medular.

**3.5.4.1 Síndrome de Brown Séquard:** Es una hemisección lateral de la médula espinal a cualquier nivel que se caracteriza clínicamente por presentar una debilidad motora y pérdida de la propiocepción ipsilateral al lado de la lesión, junto con la pérdida de sensación de temperatura y dolor en el lado contralateral (Meena, Kataria, Sharma & Sardana, 2016).

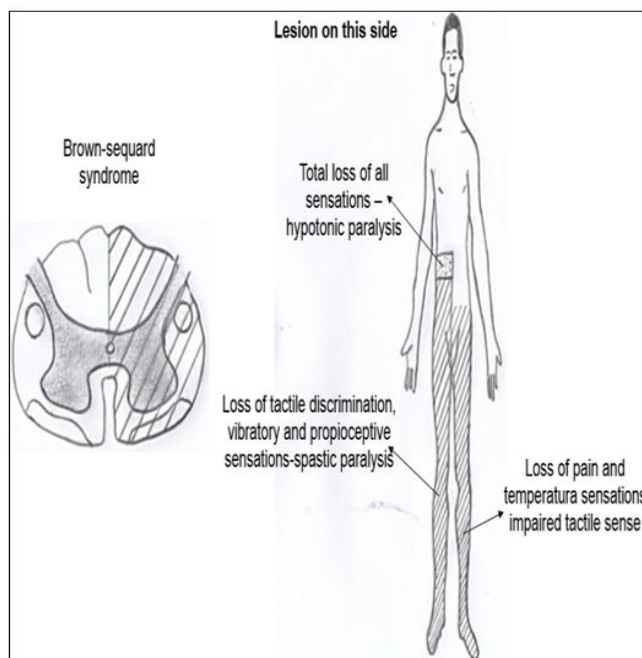
El síndrome neurológico se caracteriza por:

- Parálisis flácida y pérdida total de sensación ipsilateral en el nivel del dermatoma de la lesión (daño en el asta anterior y posterior)
- Parapesia espástica y pérdida de la propiocepción y sensación vibratoria ipsilateral por debajo del nivel de la lesión (daño en el tracto corticoespinal lateral y columnas posteriores)
- Pérdida contralateral de dolor y sensación de temperatura unos niveles por debajo de la lesión. Los tractos espinotalámicos viajan ipsilateralmente entre uno y dos segmentos antes de cruzar al lado opuesto, por lo cual la pérdida contralateral de la sensación espinotalámica comienza unos pocos niveles espinales debajo del sitio de la lesión) (Díaz & Morales, 2016).

Etiológicamente el síndrome de Brown–Séquard se clasifica en: lesiones de tipo tumoral como las neoplasias primarias, metástasis o síndromes paraneoplásicos, lesiones traumáticas que incluyen contusiones directas o por proyectiles de arma de fuego y otras lesiones penetrantes o el síndrome por hernias discales, espondilosis cervical, esclerosis múltiple, hemorragia epidural o subdural, algunas infecciones y con menor frecuencia las de tipo isquémico y congénito (Sandoval & Peña, 2008).

Las causas traumáticas de lesión medular, son las más comunes e incluyen accidentes de tráfico, caídas y accidentes relacionados con el deporte, lesiones penetrantes y heridas de proyectil, siendo la región torácica la más comúnmente involucrada (Komarowska, Debek, Wojnar, Hermanowicz, & Rogalski, 2013, Meena et al., 2016). De las lesiones de la médula espinal, los pacientes con Brown–Séquard tienen el mejor pronóstico (Díaz & Morales, 2016); sin embargo, es raro encontrar el síndrome en su forma clásica ya que es más frecuente el síndrome de hemisección incompleta con preservación de la propiocepción y sensación de vibración ipsilateral, dada la conservación de las columnas posteriores o el síndrome con otros daños adicionales, denominado Brown-Séquard Plus (Komarowska et al., 2013; Ranga & Aiyapan, 2014; Sandoval & Peña, 2008).

**Figura 7. Síndrome de Brown-Séquard**



Fuente: Tomado de Snell (2007)

**3.5.5 Fisiopatología de la lesión medular.** La lesión de la médula espinal conduce a complejas interacciones celulares y moleculares dentro del SNC necesarios para poder reparar el daño inicial del tejido (Zhang, Yin, Xu, Wu, & Chen, 2012). Esta fisiopatología consiste en una fase primaria que implica una lesión mecánica inicial, seguida de una fase secundaria tardía con alteración vascular, inflamación y excitotoxicidad (Siddiqui, Khazaei & Fehlings, 2015).

**3.5.5.1 Fase primaria:** la columna vertebral ejerce una fuerza mecánica directa sobre la médula espinal rompiendo axones, vasos sanguíneos y membranas celulares (Rowland, Hawryluk, Kwon & Fehlings, 2008). Esto es más común en una lesión compresiva/contusiva que causa cizallamiento, laceración y estiramiento agudo. Las lesiones que transectan completamente la médula espinal son raras y por lo general algunas conexiones se preservan (Siddiqui et al., 2015).

Fuerzas mecánicas aplicadas en el sitio de la lesión cortan las membranas celulares neuronales y endoteliales produciendo una zona hemorrágica de necrosis que se localiza

principalmente en la sustancia gris, con muerte rápida de las neuronas y células de la glía, seguida de un shock espinal con pérdida inmediata de la función en el nivel de la lesión y por debajo de éste. El primer cambio patológico se caracteriza por una tumefacción generalizada de la médula espinal con hemorragia en la sustancia gris central, en la cual las células comienzan a sufrir necrosis debido a la interrupción mecánica directa de las membranas celulares o por la isquemia resultante de la interrupción en el flujo vascular. La interrupción de la microvasculatura también produce hemorragia en la sustancia blanca. La hemorragia y la tumefacción se combinan para producir isquemia en la médula extendiéndose a varios niveles (Rowland et al., 2008). También puede existir un aumento en la liberación de glutamato a nivel extracelular a concentraciones excitotóxicas y una sobrerregulación de citoquinas proinflamatorias principalmente TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  (Siddiqui et al., 2015).

La preservación de la viabilidad axonal una vez ocurrida la LM, también depende de la presencia de mielina, ya que una lesión medular puede causar un daño axonal difuso, siendo los axones mielinizados más vulnerables que los no mielinizados debido a que las fuerzas longitudinales que extienden las fibras se concentran en los nodos de Ranvier; además, la interrupción de los microtúbulos axonales después de la LM tiende a localizarse en las regiones nodales (Profyris et al., 2004).

#### **3.5.5.2 Fase secundaria: ésta se subdivide temporalmente en:**

- Fase aguda: ésta, se caracteriza porque los procesos secundarios de lesión se vuelven más dominantes, siendo objetivo para intervenciones neuroprotectoras, debido a que es lo más temprano que un paciente puede llegar a un hospital. Dentro de esta fase se encuentra la etapa aguda temprana y subaguda.

La etapa aguda temprana cursa entre 2 y 48 horas después de la lesión, la hemorragia persiste, aumenta el edema y la inflamación y se inicia la producción de radicales libres, desregulación iónica, excitotoxicidad mediada por glutamato y neurotoxicidad, contribuyendo todas ellas a la lesión axonal con muerte celular. La

interrupción del flujo microvascular, la hipotensión y el aumento de la presión intersticial, conducen a la hipoperfusión de la médula después de la lesión. La isquemia, da lugar al hinchamiento de células con sustancias a su vez citotóxicas que afecta a las neuronas y a la glía; además, la hinchazón axonal bloquea los potenciales de acción, afectando la conducción sináptica (Rowland et al., 2008; Siddiqui et al., 2015).

La desregulación iónica y la excitotoxicidad contribuyen al daño y a la pérdida de un gran número de células. La sobrerregulación del calcio, conduce a la muerte celular por disfunción mitocondrial, con producción de radicales libres y activación de calpainas. Además, los niveles extracelulares de glutamato aumentan después de la lesión, interrumpiendo los transportadores de membrana que mantienen la homeostasis de los iones y del glutamato, sobre activando así el receptor del glutamato, lo que conlleva a su vez un aumento del flujo de iones de sodio y calcio a través de los receptores NMDA y AMPA.

Todo lo anterior, conduce a la desregulación de la actividad metabólica y mitocondrial y a la pérdida del equilibrio osmótico que finalmente da lugar a la muerte celular excitotóxica (Siddiqui et al., 2015).

La lesión mediada por radicales libres es un factor importante que obedece a la peroxidación lipídica y que contribuye significativamente a la disrupción axonal y a la muerte de neuronas y células de glía. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NRS) pueden ser producidas por macrófagos y células de la microglía después de la lesión o incluso como resultado de la isquemia y la reperfusión. Los niveles de ROS obtienen su pico a las 12 horas después de la lesión y se mantienen elevados durante 1 semana (Rowland et al., 2008; Siddiqui et al., 2015).

En el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE) funciona como un filtro selectivo que limita el transporte de compuestos tanto dentro como fuera del parénquima. Después de una LM, hay un aumento de la permeabilidad de la BHE debido a la interrupción

mecánica directa de la lesión primaria y los efectos sobre las células endoteliales por mediadores inflamatorios y otros compuestos que se sobregulan después de la lesión.

La etapa aguda temprana implica la infiltración por células inflamatorias y la activación continua de la microglía residente. El proceso inflamatorio involucra numerosas poblaciones celulares, incluyendo astrocitos, microglía, células T, neutrófilos y monocitos. La microglía continúa proliferando y atrae leucocitos periféricos y otras células del sistema inmune a través de la producción de citoquinas que sobregulan la producción de quimiocinas. Dentro de las 24 horas de ocurrida la lesión medular, los neutrófilos producen citoquinas, MMPs, superóxido dismutasa y mieloperoxidasa. Los neutrófilos actúan para ayudar a la quimiotaxis y extravasación de leucocitos, así como la activación de la glía que puede ser perjudicial para las neuronas. Los monocitos comienzan a ser reclutados a medida que los niveles de neutrófilos dejan de aumentar hacia las 48 horas. A las 72 horas después de la lesión, los monocitos comienzan a diferenciarse en macrófagos y producen glutamato, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y prostanoïdes que pueden exacerbar las lesiones secundarias. El número de macrófagos comienza a disminuir 7 días después de la lesión, pero la activación de la microglía puede persistir durante semanas después de la lesión.

Por último, se presentan la muerte celular y la desmielinización. La mayor parte de la muerte de las células neuronales después de la lesión ocurre a través de la necrosis, aunque la apoptosis también juega un papel importante. La muerte celular de los oligodendrocitos se produce a través de la apoptosis, que depende parcialmente de la activación del receptor Fas y de la señalización del receptor de neurotrofina p75. La mayoría de los receptores Fas en la médula espinal se encuentran en oligodendrocitos y se expresan por la microglía y linfocitos activados. La interacción entre los dos conduce a la apoptosis a través de la activación de las caspasas.

La etapa subaguda dura aproximadamente de 2 días a 2 semanas después de la lesión, en donde la respuesta fagocítica es máxima y benéfica para la eliminación de los

desechos celulares en el área afectada; en cierto grado, promueve el crecimiento axonal a través de la eliminación de los residuos de mielina. Los astrocitos pasan por muerte celular necrótica, pero en la periferia de la lesión se tornan hipertróficos y proliferativos. Los procesos citoplasmáticos se unen para convertirse en la cicatriz astrocítica que forma una barrera física y química impidiendo la regeneración axonal (Siddiqui et al., 2015); sin embargo, los astrocitos son fundamentales para el restableciendo la integridad de la BHE después de la LM (Rowland et al., 2008).

**3.5.6 Shock medular.** Es un estado fisiológico transitorio, en el cual desaparece la función refleja de la médula espinal por debajo de la lesión, con pérdida de la motricidad y de la sensibilidad, incluyendo la pérdida del tono rectal y la supresión de la función medular autónoma, independientemente de los centros nerviosos superiores. Se produce una hipertensión arterial sistémica, seguida de una hipotensión marcada, parálisis flácida con hiporreflexia vesical e intestinal. Esta sintomatología puede durar de unas horas a varios días, hasta que la actividad refleja (arco reflejo) por debajo de la lesión se restablece (Forner, 2011; Strassburguer et al., 2004)

Independientemente del nivel de la lesión medular y del grado completo o incompleto de la misma, la falta de actividad nerviosa por debajo de la zona lesionada produce una fase temporal de inexcitabilidad y a nivel vesical el funcionamiento voluntario o involuntario de la vejiga desaparece, resultando en una vejiga neurógena o disfunción vesical neurogénica y disinergia vésico-esfinteriana.

Una vez superada la fase de shock medular, dependiendo del nivel de la lesión, se puede establecer el estado de vejiga neurógena hiperrefléxica (automática), caracterizada porque los centros de la micción (T10–L2 y S2–S4) no están lesionados, se conserva el arco reflejo y funcionan aunque sin control del cerebro (Esclarín De Ruz & De Pinto Benito, 2002; Forner, 2011). La LM ocurre por arriba de L1, interrumpiendo la comunicación entre el núcleo pontino y los segmentos sacros, dejando libres de control a los reflejos medulares, por lo tanto, cuando el detrusor se contrae para iniciar la fase de vaciado de la vejiga, el cuello vesical y el esfínter externo pueden permanecer

cerrados impidiendo o dificultando el vaciamiento vesical (disinergia vesicoesfinteriana); la LM por encima de T6, puede provocar disreflexia autónoma (Strassburguer et al., 2004).

### **3.6 BIOMARCADORES**

En la lesión traumática de la médula espinal se ha hecho énfasis en la evaluación de la gravedad de la misma y en la predicción del potencial de recuperación. Las intervenciones para la recuperación de la función medular incluyen enfoques farmacológicos, quirúrgicos y de rehabilitación. Sin embargo, los beneficios de estas intervenciones no son unívocos en los ensayos clínicos y los pacientes con una lesión medular más severa, responden de manera diferente a los pacientes con LM menos grave frente a las intervenciones neuroprotectoras (Pouw et al., 2009).

De otra parte, el examen neurológico aporta la primera información sobre la lesión y establece las directrices para los procedimientos de imagen con el fin de confirmarla. Debido al shock espinal, a la condición inestable de los pacientes y al estado de éstos bajo el efecto del alcohol o drogas, las puntuaciones motoras de ASIA, no puede considerarse confiables y sólo ofrecen estados clínicos estáticos, sin que aporten datos sobre un posible desarrollo futuro (Tascu, Iencean, ST & Iencean, A, 2016). Estas limitaciones, han llevado a desarrollar nuevas ideas para la medición objetiva y cuantificable de marcadores útiles que conduzcan a probar nuevas terapias en la LM aguda (Elizei & Kwon, 2017).

Por lo anterior, es preferible abordar pruebas diagnósticas tempranas y precisas que permita diferenciar el estado de gravedad de la LM e indicar intervenciones neuroprotectoras. Actualmente, se recurre a un nuevo enfoque para establecer el daño primario de la LM en la fase aguda mediante la evaluación de las concentraciones de ciertos biomarcadores en LCR y/o sangre (Pouw et al., 2009), además de ser una herramienta para caracterizar mejor a los pacientes con LM, predecir los resultados y proponer el manejo terapéutico más adecuado (Cruz, Coelho, Antunes, & Cruz, 2015).



**3.6.1 Definición.** Un biomarcador o marcador biológico (como una sustancia o molécula bioquímica) (Gómez, Sampeieri, & Carmona, 2013; Gonzáles, 2013) es una característica que se mide y evalúa como un indicador de procesos biológicos normales, patógenos o respuestas a una exposición o intervención, incluyendo intervenciones terapéuticas (Bogoslovsky, Gill, Jeromin, Davis, & Diaz, 2016; Pouw et al., 2009).

Los biomarcadores se consideran herramientas importantes para identificar él o los agentes causantes de una patología específica (Elizei & Kwon, 2017), asociándose a cada paso del procesamiento de genes a proteínas o de los metabolitos que se producen durante las subsecuentes reacciones a infecciones intracelulares y se puede esperar que ayuden a comprender la causa, gravedad y progresión de la enfermedad para así poder establecer el pronóstico, desarrollar nuevos fármacos y obtener información sobre los efectos de un tratamiento determinado (Cruz et al., 2015; Nishida, 2014). Los biomarcadores de LM tienen el potencial de facilitar en gran medida la traducción de nuevas terapias para la LM aguda (Elizei & Kwon, 2017).

**3.6.2 Características.** Un marcador de lesión del SNC debe tener características específicas para permitir la diferenciación entre patologías o afecciones, ya que se pueden presentar múltiples tipos de lesión, que a su vez pueden afectar a diversas células diana con diferentes estados de gravedad; además, la existencia de la BHE condiciona las características estructurales de dichos biomarcadores, que deben atravesarla para poder ser liberados al torrente sanguíneo.

Por lo anterior, un biomarcador debe presentar alta especificidad y sensibilidad por el tejido lesionado, siendo liberado únicamente tras una lesión del tejido y detectarse en LCR y sangre rápidamente tras el daño. Un biomarcador, deberá reflejar la gravedad de la lesión siguiendo un curso temporal conocido; además, las herramientas para el análisis y la detección inmediata deben estar disponibles y ser reproducibles.

De otra parte, es de vital importancia que la detección y cuantificación de un biomarcador tenga relevancia clínica. Cabe resaltar que los biomarcadores son elementos dinámicos con cambios que responden a diferentes estados inflamatorios, fenómenos de necrosis

tisulares y lesiones por estrés oxidativo, por lo tanto, para que adquieran significancia, es necesario realizar mediciones seriadas en lugar de determinaciones aisladas (Gordillo, Egea, Rodríguez, & Murillo, 2016). En general, los biomarcadores deben ser confiables, específicos y útiles para orientar a los investigadores, así como a los clínicos en un diagnóstico más preciso que permita mejorar el tratamiento de una enfermedad en particular (Gómez et al., 2013).

En el caso de la LM, en el cual la causa es fácilmente identificable, los biomarcadores pueden ser indicadores bioquímicos que permitan la detección e intensidad de la lesión secundaria, para monitorear su progreso y predecir la gravedad de la lesión, particularmente, en una etapa temprana con el fin de hacer una predicción más exacta sobre como progresara el paciente, dar seguimiento a la formación de la cicatriz y buscar tratamientos nuevos y más eficaces (Cruz et al., 2015; Tascu et al., 2016).

**3.6.3 Biomarcadores en tejido, LCR, sangre y orina.** En los últimos años se han evaluado una serie de biomarcadores protéicos para detectar lesiones neurológicas y se han realizado estudios sobre su posible valor diagnóstico y predicción para las lesiones de la médula espinal. La concentración de proteínas específicas en la sangre o en el LCR debe ser comparada con la lesión del tejido nervioso y estos pueden ser biomarcadores para los procesos patológicos en la LM (Tascu et al., 2016).

La sangre, la orina, el LCR y las muestras de tejidos del sitio afectado, han sido la principal fuente de biomarcadores de las enfermedades del SNC. La sangre y la orina se recogen fácilmente, pero los tejidos del SNC y el muestreo del LCR son más difíciles y pueden ocasionar un riesgo de morbilidad significativa. Sin embargo, la BHE es altamente selectiva, lo que significa que los procesos patológicos en el SNC no se reflejan necesariamente en la sangre, a menos que su permeabilidad se incremente (Nishida, 2014).

**3.6.4 Clasificación de los biomarcadores.** Los biomarcadores de la LM se pueden abordar de dos maneras: mediante un estudio directo del daño estructural primario usando un

marcador único específico o marcadores de daño tisular (biomarcadores estructurales) o midiendo aspectos de las cascadas celulares, bioquímicas o moleculares en la lesión secundaria (biomarcadores inflamatorios) o durante el proceso de reparación (Pouw et al., 2009).

**3.6.4.1 Biomarcadores estructurales:** estos biomarcadores son liberados por las células situadas en el sitio de la lesión y se liberan al LCR. Si la BHE está comprometida, algunos biomarcadores se liberan a la circulación sanguínea y pueden detectarse en suero o en plasma sanguíneo. Ejemplos de tales biomarcadores incluyen proteínas citoesqueléticas de neuronas, células gliales y metabolitos celulares (Cruz et al., 2015). También ha habido un notable interés en las proteínas estructurales del sistema nervioso central (SNC), incluyendo S100 $\beta$  y NSE como biomarcadores de daño en el tejido del SNC (Hajduková et al., 2015).

**3.6.4.2 Biomarcadores inflamatorios:** durante la segunda etapa de la LM se activan una serie de vías degenerativas acompañadas de una respuesta inflamatoria. La alteración de la BHE induce la síntesis y liberación de citoquinas pro-inflamatorias y otros mediadores inflamatorios tales como interleuquinas y factor de necrosis tumoral (TNF) en el LCR, que eventualmente pueden extravasarse al suero (Cruz et al., 2015).

### **3.7 ENOLASA**

Es una enzima glucolítica clave que cataliza la deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, en los últimos pasos de la vía glucolítica. Es una metaloenzima que requiere el ion metálico magnesio ( $Mg^{2+}$ ) para ser catalíticamente activo (Li et al., 2014). La enzima glucolítica enolasa (2-fosfo-D-glicerohidrolasa) está compuesta por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y existe en forma dimerica (Gonzáles, 2013). Sus isoformas son específicas del tipo celular, tales como  $\alpha\alpha$  en la mayoría de los tejidos adultos,  $\alpha\gamma$  y  $\gamma\gamma$  en las neuronas y  $\alpha\beta$  y  $\beta\beta$  en las células musculares.

La enolasa se puede localizar en el citoplasma, núcleo y la superficie celular de varias células de mamíferos para mediar distintas funciones; sin embargo, tras señales estimuladoras, la enolasa puede translocarse en la superficie celular y contribuir a la inducción de respuestas inmunes inflamatorias en el huésped.

**3.7.1 Enolasa específica neuronal (NSE).** Es la forma neuronal de la enzima enolasa glucolítica y representa la isoenzima enolasa dominante que se encuentra en los tejidos neuronal y neuroendocrino (Haque, Ray, Cox, & Banik, 2015). Las dos isoenzimas formadas por la subunidad  $\gamma$  ( $\alpha\gamma$ , y  $\gamma\gamma$ ) constituyen la NSE del grupo de enzimas hidrolíticas, que presenta un peso molecular de 78 kDa (González, 2013); su isoforma  $\gamma\gamma$  es específica del tejido neuronal, mientras que la isoforma  $\alpha\gamma$  está presente en células endocrinas, eritrocitos y plaquetas (Gordillo et al., 2016). También se conoce como enolasa 2, con una vida biológica en los fluidos corporales de aproximadamente 24 horas (Haque et al., 2015).

NSE es una proteína citosólica que participa en el transporte axonal, y sus niveles de expresión pueden fluctuar dependiendo de la demanda de energía dentro de una célula. NSE normalmente no se secreta en los fluidos extracelulares por las neuronas intactas, sin embargo, cuando los axones se lesionan, NSE se regula para mantener la homeostasis celular (Yokobori et al., 2015). Basado en su origen y función celular, NSE es un marcador que evalúa directamente el daño funcional a las neuronas (Kawata et al., 2016).

**3.7.1.1 NSE en la lesión medular aguda.** Existen efectos adversos de NSE en la superficie celular después de la LM, alterando las funciones neuronales, gliales e inmunitarias que conducen a respuestas inflamatorias.

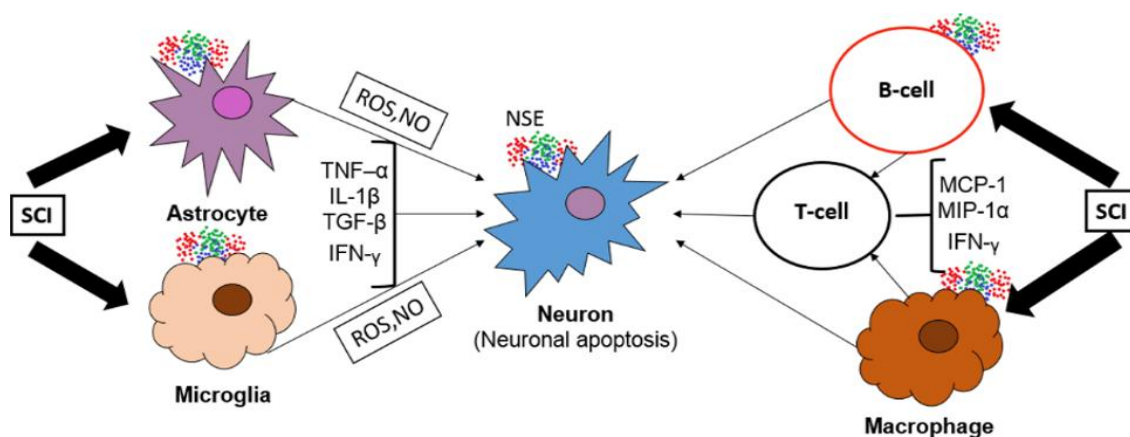
La expresión de NSE se eleva a niveles tóxicos en la microglía y astrocitos después de la lesión. Esta también se aumenta en macrófagos y células B después de la lesión, promoviendo la degradación de la matriz extracelular, producción de citoquinas y

quimiocinas proinflamatorias e invasión de células inflamatorias en los sitios de lesión (Haque, Capone, Matzelle, Cox, & Banik, 2017).

La translocación rápida de NSE desde el citosol a la superficie celular conduce a una serie de eventos como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) y quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ), que contribuyen a la muerte neuronal.

Los macrófagos, la microglía y las células B pueden favorecer la presentación del antígeno, la activación de las células T y la producción de citoquinas inflamatorias, que a su vez, pueden agravar el proceso inflamatorio y la muerte neuronal después de la lesión (Haque et al., 2015)

**Figura 8.** Efectos adversos de NSE después de la lesión medular



Fuente: Tomado de Haque et al., (2015)

También la expresión de NSE en la superficie celular promueve la migración, la supervivencia y el crecimiento celular además del proceso inflamatorio después de la lesión.

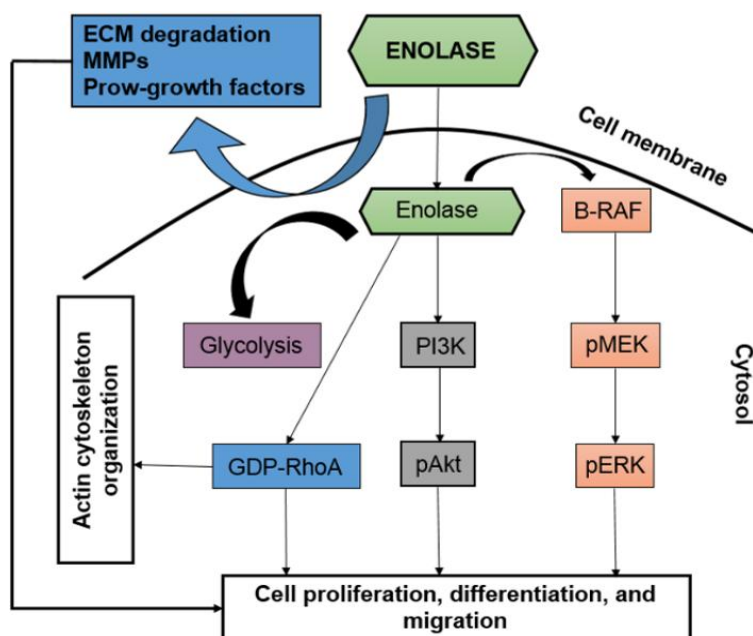
La NSE es una enzima glucolítica multifuncional que actúa como una proteína de unión al plasminógeno y está implicada en la hipoxia y la isquemia (Kawata et al., 2016). La

NSE en la superficie celular activa el plasminógeno, que es una serina proteasa presente en el suero como una proenzima inactiva, y se convierte por el activador del plasminógeno tisular (Tpa) o el activador del plasminógeno uroquinasa (Upa) a plasmina activa, para degradar las proteínas de la MEC. La plasmina degrada la fibronectina, penetra el endotelio y activa las metaloproteinasas de la matriz (MMP) que son fundamentales en la producción y mantenimiento de un microambiente proinflamatorio que regula NSE y promueve la degradación de la MEC, agravando la neuropatología isquémica.

Tras la activación de la plasmina/MMP por el aumento de la expresión de NSE, también se puede conducir a las vías MEK/ERK y Rho, induciendo la proliferación, la diferenciación y la migración celular. La elevación de NSE también promueve la glicólisis, la proliferación celular y la migración a través de la vía PI3K/Akt. NSE influencia la actividad neurotrófica y regula el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia e incluso la regeneración de las neuronas a través de la activación de la vía PI3K/AKT.

La activación de PI3K mediada por NSE regula la quinasa Rho que puede influir en la reorganización del citoesqueleto de actina, la inducción del crecimiento de neuritas y la detención del crecimiento en células neuronales y la inhibición de la quinasa ROCK asociada a Rho produce una proliferación celular inducida por NSE, polimerización de actina y crecimiento celular (Haque et al., 2015).

**Figura 9.** Expresión NSE en la migración, supervivencia y crecimiento celular.



Fuente: Tomado de Haque et al. (2015)

**3.7.1.2** NSE en células neuronales y gliales. La expresión de NSE también se detecta en cultivos de oligodendrocitos (OLGs) y se eleva durante la diferenciación de precursores de OLGs en OLGs maduros, aunque se reprime totalmente en OLGs maduros.

NSE es detectable en neoplasias gliales y células gliales reactivas mientras se someten a cambios morfológicos. También se expresa en astrocitos, pero a niveles muchos más bajos que en las neuronas y OLGs. La NSE en la superficie celular puede impulsar la activación de la microglía con regulación positiva del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC-1) y (MHC-II), que a su vez puede inducir respuestas inflamatorias después de la LM aguda.

**3.7.1.3** NSE en LCR y sangre. Se han encontrado mediciones de NSE en LCR y sangre, que se eleva en diferentes enfermedades inflamatorias que implican la destrucción neuronal; por lo tanto, niveles elevados de NSE, se consideran como un marcador de la lesión neuronal (Haque et al., 2015).

El nivel normal basal de NSE en suero es inferior a 10 ng/ml que se origina en los glóbulos rojos (Kawata et al., 2016), estando presente en eritrocitos, plaquetas sanguíneas, células plasmáticas, linfocitos, paredes capilares y células mioepiteliales, lo que explica sus concentraciones fisiológicamente bajas en la sangre (Hajduková et al., 2015).

### 3.8 S100

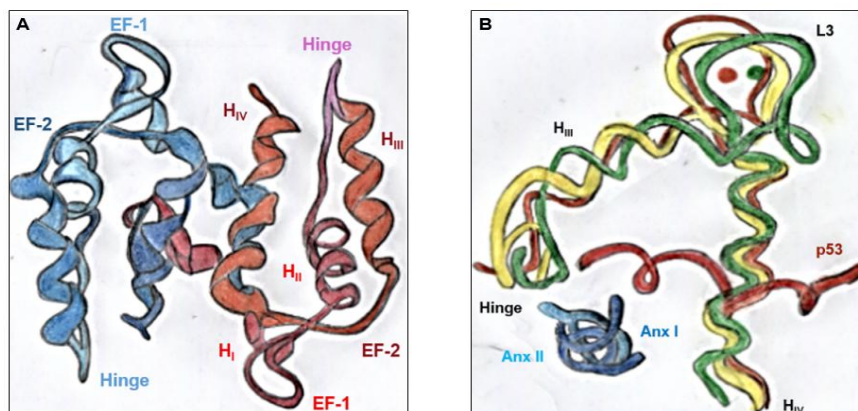
El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) funciona como un mensajero que regula una gran variedad de procesos celulares en un determinado espacio y tiempo. La red de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  está conformado por muchos componentes moleculares, incluyendo las proteínas S100 que representan el subgrupo más grande del grupo de proteínas vinculantes de  $\text{Ca}^{2+}$  caracterizadas por el motivo estructural EF-hand (Sedaghat & Notopoulos, 2008), en donde hasta la fecha han sido identificadas 25 proteínas pertenecientes a esta familia (Gazzolo & Michetti, 2010; Heizmann, Fritz, & Schafer, 2002). Estas proteínas, han recibido una creciente atención en los últimos años debido a su expresión específica en células y tejidos y su implicación en varias enfermedades (Heizmann et al., 2002). El termino S100 es debido a su solubilidad en una solución saturada al 100% de sulfato de amonio a pH neutro (Michetti et al., 2012; Sedaghat & Notopoulos, 2008).

Las proteínas S100 son pequeñas proteínas ácidas con una masa molecular de 10-12 kDa que forman homó y heterodímeros, excepto la calbindina 3, que es monomérica (Marenholz, Heizmann, & Fritz, 2004). Las proteínas S100 se presentan en estado libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , enlazadas al  $\text{Ca}^{2+}$  y en complejos con ciertos péptidos diana.

Cada monómero de S100 consta de dos dominios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  de hélice-bucle-hélice denominados EF-hands. Como se aprecia en la figura 9, el dominio N-terminal formado por las hélices  $\text{H}_I$  y  $\text{H}_{II}$  conectadas por el bucle  $\text{L}_1$  es diferente del motivo canónico EF-hands y por lo tanto se denomina “S100-specific” o “pseudo EF-hand”, mientras que el dominio C-terminal ( $\text{H}_{III}$ -  $\text{L}_3$ - $\text{H}_{IV}$ ) contiene el motivo canónico EF-hand (Figura 9A)



**Figura 10.** Proteínas S100. A) Estructura dimerica de las proteínas S100. B) Complejos de unión de las proteínas S100.



Fuente: Tomado de Heizmann et al., (2002)

Sobre la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  casi todas las proteínas S100 experimentan un cambio conformacional exponiendo un parche hidrofóbico previamente cubierto. Puesto que las hélices H<sub>I</sub> y H<sub>IV</sub> están implicadas en la formación de dímeros, su posición en la molécula está restringida; por lo tanto, solo las hélices H<sub>II</sub> o H<sub>III</sub> se presentan como candidatos para un cambio conformacional. Las estructuras de S100A1, S100 $\beta$  y S100A6 en estado libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y enlazados a  $\text{Ca}^{2+}$ , revelan que sólo la EF-hand canónica C-terminal (H<sub>III</sub>-L3-H<sub>IV</sub>) experimenta un cambio conformacional en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Hasta ahora, se han caracterizado tres complejos diferentes S100-diana: S100 $\beta$  en complejo con un péptido del dominio regulador de p53, S100A10 con un péptido de anexina II y S100A11 en complejo con un péptido de anexina I. Los tres péptidos se localizan en una cavidad formada por hélices H<sub>II</sub> y V<sub>II</sub> en la conformación abierta de la EF-hand canónica C-terminal (Figura 9B). La unión de los péptidos objetivos con la matriz proteica se logra mediante interacciones hidrofóbicas e iónicas (Heizmann et al., 2002).

De otra parte, se ha demostrado que algunos miembros de S100 se enlazan al zinc y/o al cobre, lo que sugiere la posibilidad de que en algunos casos su actividad biológica pueda estar regulada por estos metales (Michetti et al., 2012). Un ejemplo dependiente de  $\text{Zn}^{2+}$  es el reconocimiento de proteínas diana en la interacción de S100 $\beta$  con la

proteína tau (inhibición de la fosforilación de la proteína tau por la proteína quinasa II) confiriéndole propiedades neuroprotectoras. También el  $\text{Cu}^{2+}$  vinculante a S100 $\beta$  podría tener una función neuroprotectora (Sedaghat & Notopoulos, 2008).

Las proteínas S100 están generalmente implicadas en un gran número de actividades celulares tales como la transducción de señales, la diferenciación celular, la regulación de la motilidad celular, la transcripción y la progresión del ciclo celular. Aparte de estas funciones intracelulares, algunas proteínas S100 como S100A8/A9, S100 $\beta$ , S100A4 y otras, pueden ser segregadas de células y tener funciones extracelulares parecidas a las citoquinas, incluyendo actividades quimiotácticas relacionadas con la actividad inflamatoria (S100A8/A9 y A12), acción neurotrófica (S100 $\beta$ ) o un efecto angiogénico (S100A4). Un receptor candidato para mediar al menos algunas de las funciones extracelulares descritas es el receptor RAGE que se activaba tras la unión de S100A12 y S100 $\beta$ .

**3.8.1 S100 $\beta$ .** Es uno de los biomarcadores más extensamente estudiados para las lesiones cerebrales traumáticas (TBI). Es un miembro de la familia de las proteínas S100 de unión a iones de calcio, cobre y zinc, de bajo peso molecular (11 kDa) que regula los niveles de calcio intracelular (Kawata et al., 2016). Es metabolizada por el riñón, siendo eliminada a través de la orina, con una vida media aproximada de 30-113 min, sin verse afectada por fenómenos de hemólisis (Gordillo et al., 2016).

La proteína S100 $\beta$  homodimérica consiste en dos subunidades  $\beta$  (Kawata et al., 2016) y en el caso del sistema nervioso, se concentra en mayor grado en los astrocitos y en menor grado en otro tipo de células gliales como los oligodendrocitos, las células de Schwann, las células ependimarias, las células gliales entéricas, y en otras subpoblaciones de neuronas.

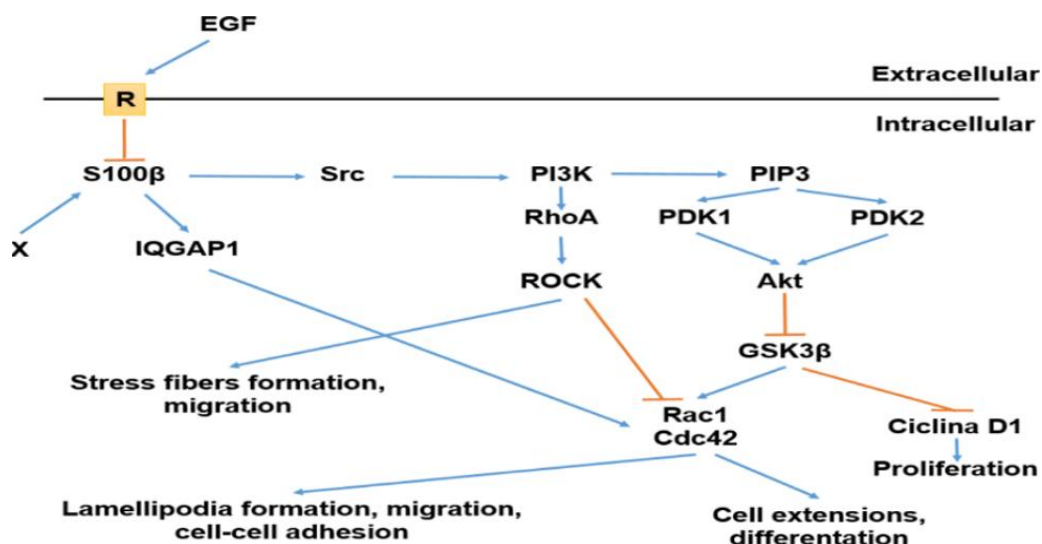
S100 $\beta$  es una proteína intracelular, pero puede ser liberada al espacio extracelular. Independientemente de su ubicación, los efectos de S100 $\beta$  parecen ser dependientes de

la concentración. Por ejemplo, es protector y trófico a bajas concentraciones, pero tóxico y pro-apoptótico en altas concentraciones (Kawata et al., 2016).

El  $\text{Ca}^{2+}$  induce cambios en el dominio catalítico C-terminal de S100 $\beta$ , exponiendo un parche hidrofóbico a través del cual la proteína interactúa con un amplia gama de proteínas diana (enzimas, sustratos enzimáticos, proteínas citoesqueléticas, factores de transcripción, canales iónicos y ubiquitina E3 ligasa) regulando así sus actividades y por lo tanto participando en la regulación del metabolismo energético, la transcripción, la fosforilación de proteínas, la proliferación celular y otras funciones como supervivencia, diferenciación, locomoción y en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo, S100 $\beta$  también puede ejercer efectos extracelulares secretada por ciertos tipos de células (astrocitos y adipocitos) o liberada pasivamente por varios tipos de células tras la lesión tisular. S100 $\beta$  se puede asociar a una proteína de daño (DAMP) o alarmina, conformando una señal de peligro capaz de activar células del sistema inmune innato. Estos efectos extracelulares han sido estudiados en el SNC, debido a la abundancia de ésta proteína en el cerebro y a la identificación de neuronas, astrocitos y microglía como sus células diana.

La interacción de S100 $\beta$  con IQGAP1 da como resultado la activación de Rac1, el cual es responsable de la formación de lamellipodia durante la fase de migración. La interacción S100 $\beta$ /IQGAP1/Rac1 también puede resultar en una mejora de la adhesión célula-célula como en las neuroesferas. S100 $\beta$ , inducida en progenitores astrocíticos por un mecanismo no identificado, interactúa y activa la vía Src/PI3K que estimula RhoA/ROCK promoviendo la formación de fibras de estrés y la migración celular y de este modo Akt inhibe GSK3 $\beta$  resultando en la estimulación de la proliferación e inhibición de la diferenciación. El EGF reprime la expresión de S100 $\beta$  durante las fases tempranas de diferenciación de astrocitos, lo que parece ser permisivo para la diferenciación terminal astrocítica. Además, S100 $\beta$  también tiene la capacidad de regular de manera indirecta, el citoesqueleto basado en actina F, mediante la estimulación de la vía Src/PI3K/RhoA/ROCK y la vía IQGAP1/Rac1 y mediante la reducción de la actividad del módulo GSK3 $\beta$ /Rac1; en contraposición a los efectos directos de las proteínas sobre los microtúbulos y los filamentos intermedios.

**Figura 11.** Interacciones S100 $\beta$ /IQGAP1/Src/PI3K/EGF



Fuente: Tomado de Sorci et al., (2010)

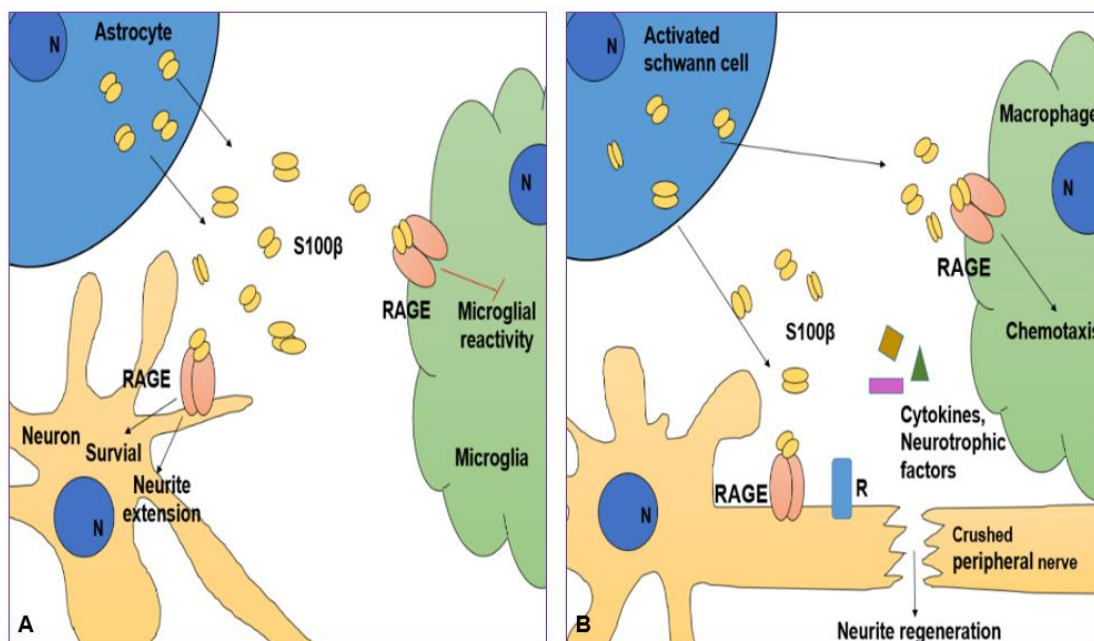
La S100 $\beta$  extracelular, también regula la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación. Varios factores regulan positivamente o negativamente la secreción de S100 $\beta$  por parte de los astrocitos, entre los que se encuentran la interleuquina-1 $\beta$ , los niveles extracelulares de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, los inhibidores de las uniones gap, antioxidantes, lipopolisacáridos, apomorfina y ciertos fármacos antipsicóticos. A la baja concentración Nm encontrada en el espacio extracelular cerebral en condiciones fisiológicas normales, S100 $\beta$  ejerce efectos de supervivencia en las neuronas, estimula la proliferación de astrocitos y reduce la reactividad microglial a través de la vía RAGE (receptor para productos finales de glicación avanzada); sin embargo, a bajos niveles Nm, S100 $\beta$  se sinergiza con citoquinas proinflamatorias para activar la microglía, por lo tanto S100 $\beta$  puede cambiar de antiinflamatorio a proinflamatorio en fases tempranas de neuroinflamación en las cuales los niveles de citoquinas inflamatorias son bajos (Figura 11A).

Otra de las funciones de la proteína S100 $\beta$ , es en la regeneración tisular. Se ha descrito que el gen de la proteína S100 $\beta$  se expresa en las células de Schwann de los nervios periféricos no lesionados, en las células de Schwann activadas durante el período de

degeneración de los nervios (hasta el día 7 después de una lesión) y en las células de Schwann normales en donde reaparece durante el período de regeneración (después del día 7 de la lesión); igualmente, en la zona proximal y distal a dicha lesión.

RAGE, se expresa en los axones y en la infiltración tisular de fagocitos mononucleares. La reducción de la expresión de RAGE o de su actividad, resulta en la supresión de la regeneración anatómica y funcional del tejido en la fase de recuperación. Tras la lesión aguda de un nervio periférico, S100 $\beta$  liberado por las células de Schwann en los nervios dañados, activa RAGE en la zona de infiltración de macrófagos y en las células de Schwann activadas; los macrófagos infiltrantes, ejercen efectos beneficiosos, participando en la limpieza de los desechos celulares y de los neutrófilos muertos, mientras que las células de Schwann activadas liberan citoquinas y factores neurotróficos, siendo estos eventos cruciales para la reparación de los nervios lesionados (Figura 11B).

**Figura 12.** Funciones de S100 $\beta$  en el SNC. A) Efectos de las concentraciones bajas de S100 $\beta$  en células neuronales y microgliales. B) S100 $\beta$  en la regeneración axonal.



Fuente: Tomado de Sorci et al. (2010)

**3.8.1.1 S100 $\beta$  en la inflamación.** S100 $\beta$  extracelular actúa como un patrón molecular asociado a una proteína de daño (DAMP), es decir, a una señal de peligro capaz de activar células del sistema inmune innato. Sin embargo, para que S100 $\beta$  pueda mantener la inflamación a través de la activación de los macrófagos/microglía tiene que estar en una concentración alta en los sitios de lesión, ya que se produce durante el daño crónico tisular como resultado de una liberación continua de la proteína de las células dañadas, necrosis celular y/o limpieza defectuosa (Sorci et al., 2010).

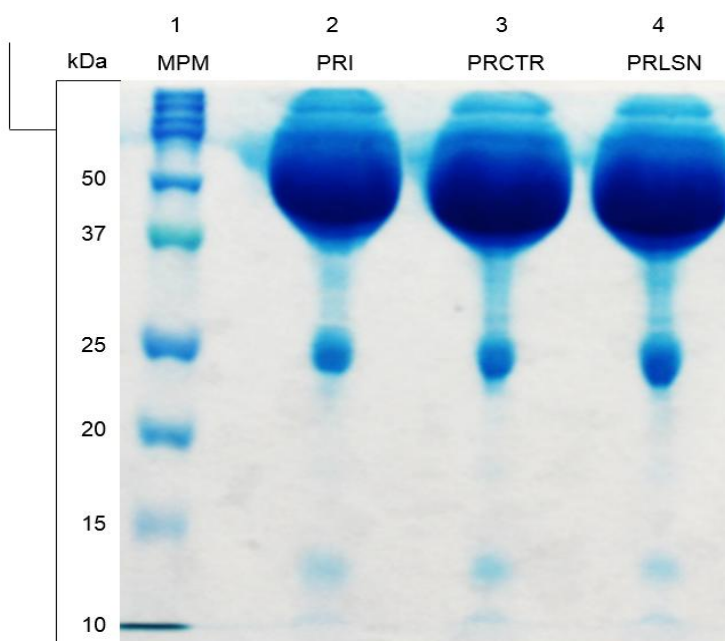
Finalmente, S100 $\beta$  se detecta en LCR y sangre, en donde el rango de normalidad de esta proteína como indicador de una lesión intracraneal fue establecido en 0,1  $\mu\text{g/L}$ ; por lo tanto, se pueden considerar como patológicos los niveles plasmáticos superiores al rango 0,13-0,20  $\mu\text{g/L}$ . Los astrocitos son importantes en la homeostasis cerebral y se activan ante cualquier daño, por lo que liberan S100 $\beta$  al espacio extracelular y de allí pasa al LCR y a la sangre a través de la BHE (González García, 2013).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 SDS-PAGE COMPARATIVO DE LAS PROTEÍNAS TOTALES EN PLASMA SANGUÍNEO DE RATONES CONTROL Y CON LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL EN FASE AGUDA (6 HORAS)**

**4.1.1** Precipitación de proteínas del plasma sanguíneo. Las muestras de plasma fueron precipitadas con acetona al 75% con el fin de aislar y reducir la concentración de proteínas mayoritarias del plasma como la albúmina, e inmunoglobulinas que representan aproximadamente el 70% del contenido proteico plasmático total y así retirar interferentes que dificultan la detección de proteínas minoritarias (Bueno et al., 2011), mejorando además la separación electroforética y resolución del bandeo de estas proteínas en las diferentes muestras de plasma mediante la técnica de inmunoblotting. Previo al análisis mediante Western blot, se realizó una comparación de las diferentes muestras del plasma precipitadas con acetona al 75% de un ratón intacto (PRI), ratón control (PRCTR) y ratón lesión (PRLSN). Todas las muestras mostraron patrones electroforéticos similares (Figura 12), y los resultados mostraron que la precipitación con acetona al 75% en todas las muestras de plasma, logró una acumulación y eliminación de proteínas mayoritarias de alto peso molecular del plasma, disminuyendo el fondo en la tinción.

**Figura 13.** SDS-PAGE comparativo de las muestras de plasma de ratón precipitadas con acetona al 75%. Marcador de peso molecular (MPM), Muestra de plasma de un ratón intacto (PRI), Muestra de plasma de un ratón control (PRCTR) y Muestra de plasma de un ratón lesión (PRLSN). La separación unidimensional se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 18%, teñidos con azul de Coomassie G-250.



Fuente: Autor

**4.1.1.1** Separación de la proteína NSE en plasma sanguíneo. Aunque se pudo evidenciar la separación de algunas proteínas de bajo peso molecular, la proteína NSE con un peso molecular de 48 kDa no se pudo diferenciar del resto de proteínas, ya que la acumulación de algunas proteínas mayoritarias de alto peso molecular presentes en el plasma sanguíneo, tanto de ratones control como lesionados a las 6 horas del procedimiento quirúrgico (Figura 12), se acumularon de tal manera que evitaron la visualización de la separación de proteínas minoritarias. En los inmunoblot, no fue posible detectar bandas de la proteína enolasa específica neuronal durante la fase aguda del trauma medular en plasma sanguíneo de ratones sometidos.



**4.1.1.2** Separación de la proteína S100 $\beta$  en plasma sanguíneo. La proteína S100 $\beta$  posee un peso molecular de 11 kDa, y aunque fue posible evidenciar un patrón de proteínas de pesos moleculares bajos, entre 10 y 15 kDa, después de la precipitación con acetona en las muestras de plasma de ratones, eliminando proteínas mayoritarias como la albúmina, la intensidad de estas fue muy baja, comparadas con el resto de bandas en el gel. Y en los inmunoblot, a membranas de inmovilón, no se detectaron niveles de la proteína S100 $\beta$  en el plasma sanguíneo de ratones tras 6 horas del trauma medular inducido.

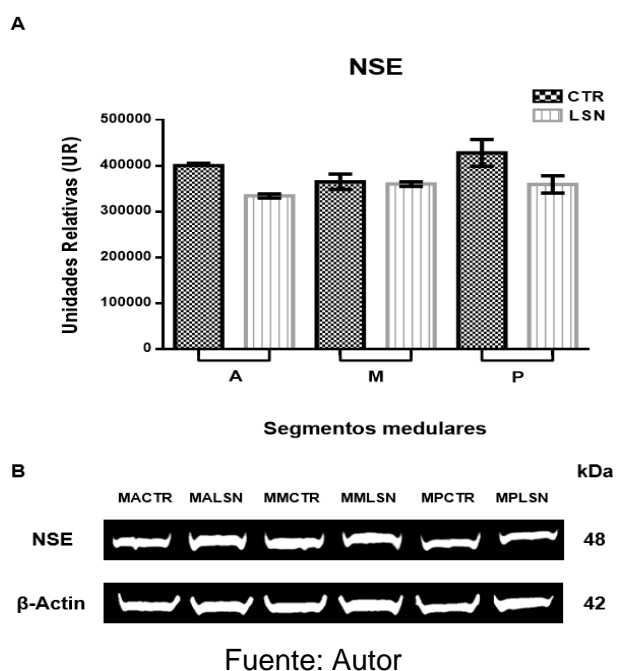
## **4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS NSE Y S100 $\beta$ EN TEJIDO MEDULAR DE RATONES CONTROL Y LESIÓN 6 HORAS DESPUÉS DE LA LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL MEDIANTE WESTERN BLOT**

Se realizó un análisis de Western blot en los pool de los sobrenadantes de los segmentos medulares de ratones control y lesión para determinar los cambios en los niveles de las proteínas NSE y S100 $\beta$  posteriores a la lesión medular en su fase aguda (6 horas después del trauma). El análisis de los datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media se realizó a través del Programa Graph Pad PRISM.

**4.2.1** Perfiles de identificación de los niveles de la proteína NSE en médula. Para esta proteína se analizaron los datos de cada sobrenadante de segmento medular por separado: médula anterior control (MACTR), médula anterior lesión (MALSN) médula media control (MMCTR), médula media lesión (MMLSN) médula posterior control (MPCTR), y médula posterior lesión (MPLSN) mediante Western blot.

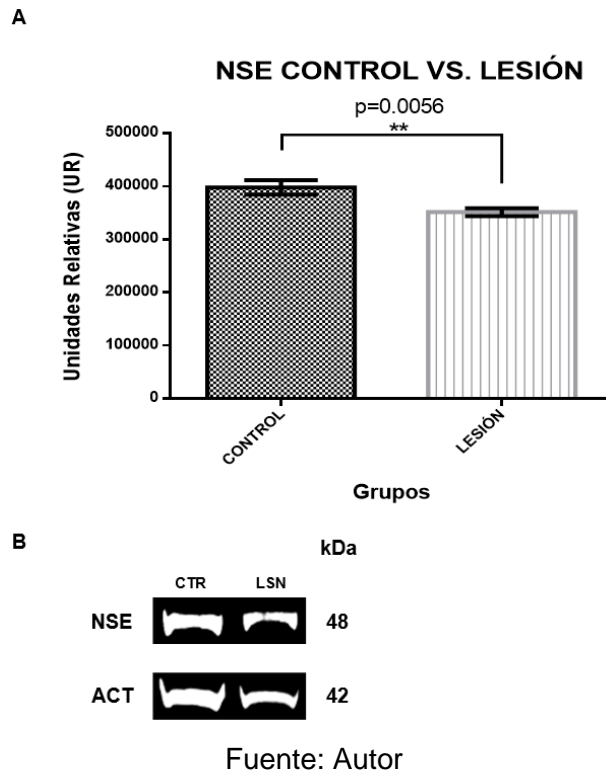
Se realizó un análisis de varianza y se aplicó comparación múltiple entre los seis grupos de los diferentes segmentos medulares mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, sin variación significativa entre las medianas de la densidad integrada, por lo cual el efecto del segmento medular afectado no pudo sustentarse en la modulación de la proteína NSE (Figura 13).

**Figura 14.** Niveles de NSE de tres segmentos medulares, A, M, P en ratones control vs. lesión medular 6 horas después del trauma. A) Efecto de la lesión medular sobre los niveles de NSE en los diferentes grupos de segmentos medulares,  $n=9$ ,  $p<0,05$ , datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. B) Bandas representativas de los niveles de NSE en los grupos respectivos, Médula anterior control (MACTR); Médula anterior lesión (MALSN); Médula media control (MMCTR); Médula media lesión (MMLSN); Médula posterior control (MPCTR); Médula posterior lesión (MPLSN). UR=Unidades relativas.



Debido a que no se observaron diferencias en el análisis anterior, se desarrolló una prueba no paramétrica de comparación de medias entre los grupos control y lesión (Student test) agrupando los datos en dos columnas sin considerarse el efecto del segmento medular. Y mediante la prueba U de Mann-Whitney se apreció una diferencia altamente significativa ( $p<0,01^{**}$ ) por efecto de la lesión, evidenciándose una reducción en los niveles de la proteína NSE en el tejido medular lesionado, independientemente del segmento medular analizado. (Figura 14).

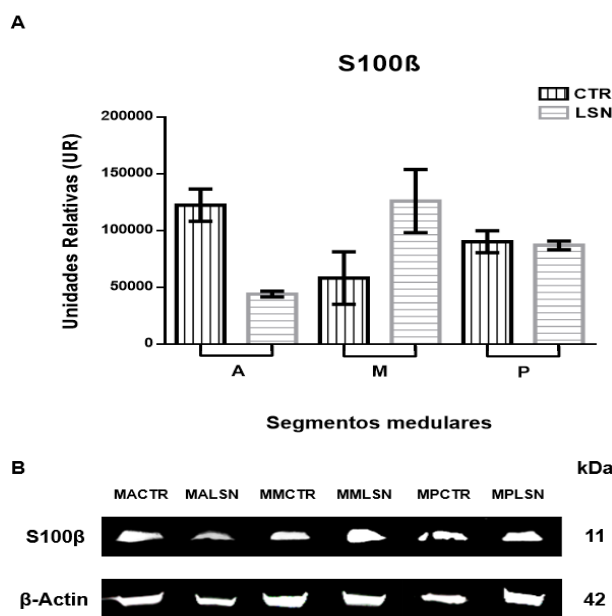
**Figura 15.** Niveles de NSE en los grupos control vs. lesión medular 6 horas después del trauma. A) Comparación de los niveles de NSE medular en los grupos control y lesión, n=9,  $p<0,05$ , datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. B) Bandas representativas de los niveles de NSE en los grupos control y lesión. UR=Unidades relativas.



**4.2.2** Perfiles de identificación de los niveles de la proteína S100 $\beta$  en médula. Similar a lo ocurrido con la NSE, el análisis discriminado entre los seis grupos de los diferentes sobrenadantes de segmentos medulares mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis no evidenció diferencias significativas (Figura 15). Por lo cual, tampoco hubo un efecto claro de la lesión medular temprana bajo el modelo empleado, es decir, 6 horas después del trauma, en la modulación de la proteína S100 $\beta$  en los diferentes segmentos medulares.

Además, los datos por columna de las réplicas de los segmentos medulares en los seis grupos fueron muy escasos (tres) y se apreció mucha variación y poca homogeneidad en los mismos.

**Figura 16.** Niveles de S100 $\beta$  de tres segmentos medulares, A, M, P en ratones control vs. lesión medular 6 horas después del trauma. A) Efecto de la lesión medular sobre los niveles de S100 $\beta$  en los diferentes grupos de segmentos medulares, n=9, p<0,05, datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. B) Bandas representativas de los niveles de S100 $\beta$  en los grupos respectivos, Médula anterior control (MACTR); Médula anterior lesión (MALSN); Médula media control (MMCTR); Médula media lesión (MMLSN); Médula posterior control (MPCTR); Médula posterior lesión (MPLSN). UR=Unidades relativas.

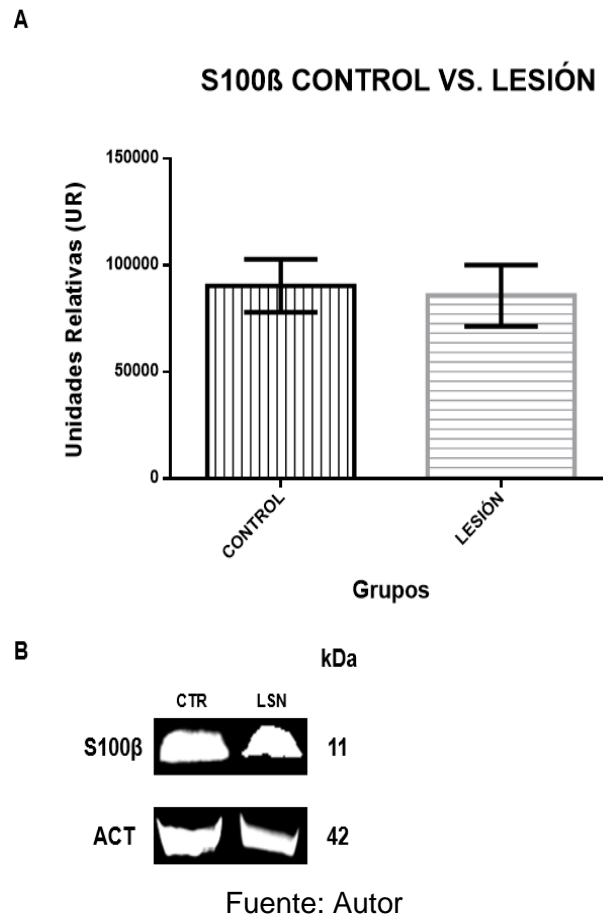


Fuente: Autor

Al no evidenciarse diferencias en el análisis anterior, para la proteína S100 $\beta$  se decidió al igual que con NSE hacer un análisis comparativo entre medias de los grupos control vs. Lesión (Student test), agrupando los datos de los segmentos medulares.

Se demostró que no existen diferencias entre estos dos grupos por lo cual se puede decir que para este estudio, no se moduló la proteína S100 $\beta$  por efecto del segmento y la lesión medular, al menos al tiempo evaluado, fase aguda temprana, 6 horas después del trauma. (Figura 16).

**Figura 17.** Niveles de S100 $\beta$  en los grupos control vs. lesión medular 6 horas después del trauma. A) Comparación de los niveles de S100 $\beta$  medular en los grupos control y lesión, n=9, p<0,05, datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. B) Bandas representativas de los niveles de S100 $\beta$  en los grupos control y lesión. UR=Unidades relativas.

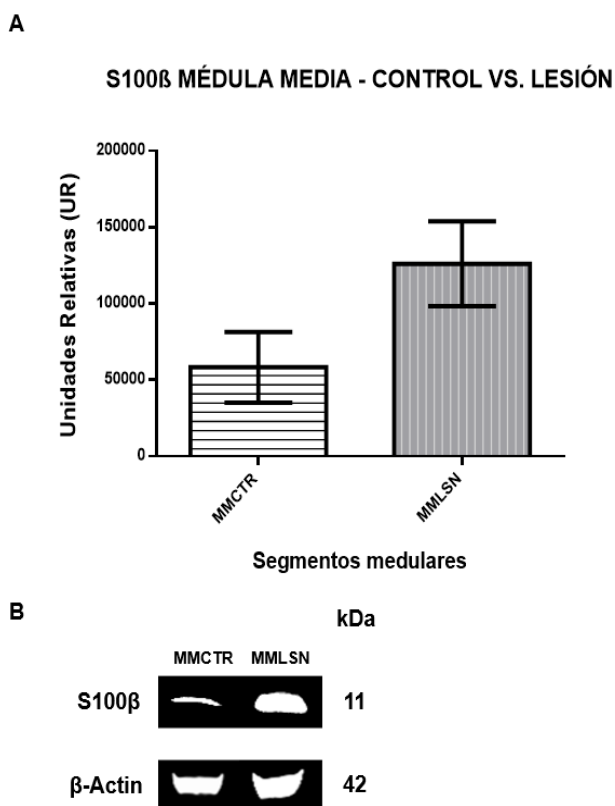


A pesar que no se evidenciaron diferencias en la modulación de la proteína S100 $\beta$  por efecto del segmento medular y en los grupos control vs. Lesión, se decidió, analizar los datos del sobrenadante del segmento medular, médula media control (MMCTR) vs. Médula media lesión (MMLSN), ya que en el análisis, de comparación múltiple entre los seis grupos de los diferentes segmentos medulares de la proteína S100 $\beta$  (Figura 15), se pudo observar una alta variabilidad entre las medianas de estos dos segmentos. Por lo cual se sometieron a una prueba no paramétrica de comparación de medias entre MMCTR vs. MMLSN (Student test).

Y mediante la prueba U de Mann-Whitney se apreció que no existen diferencias entre estos dos segmentos, por lo cual, tampoco se moduló la proteína S100 $\beta$  por efecto del segmento medular en el foco de la lesión (Figura 17). Sin embargo, se puede deducir que la obtención de datos variables y extremos, influyeron en este resultado.

Resaltando que a pesar que no existen diferencias entre los segmentos medulares MMCTR vs. MMLSN en la proteína S100 $\beta$ , si se evidenció que hay una tendencia de incremento de los valores de la proteína en el foco de la lesión (MMLSN) en comparación a los otros segmentos medulares evaluados.

**Figura 18.** Niveles de S100 $\beta$  en los segmentos medulares medios control vs. Lesión. A) Efecto de la lesión medular sobre los niveles de S100 $\beta$  en el segmento medular medio, n=9, p<0,05, datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. B) Bandas representativas de los niveles de S100 $\beta$  en los segmentos respectivos, Médula media control (MMCTR); Médula media lesión (MMLSN). UR=Unidades relativas.



Fuente: Autor

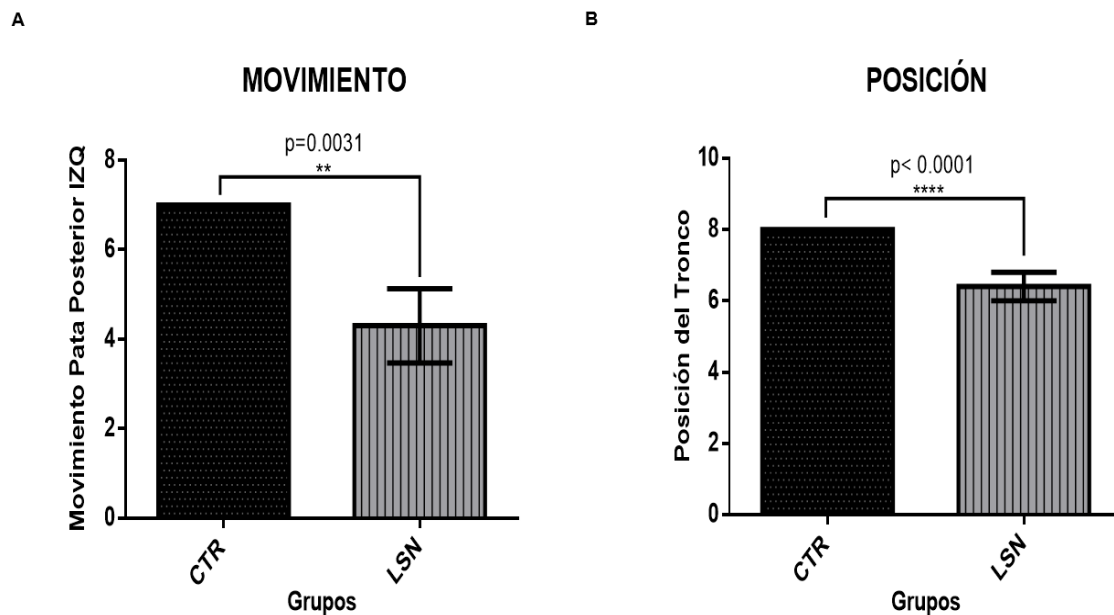
En el presente estudio, no se obtuvieron diferencias significativas entre los individuos del grupo control y lesionados en cuanto a la modulación de la proteína S100 $\beta$  mas sí en la modulación de la proteína NSE, aunque para ambos casos, independientemente del segmento medular analizado.

### **4.3 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA DE RATONES CONTROL Y LESIONADOS 6 HORAS DESPUÉS DE LA LESIÓN DE LA MÉDULA**

**4.3.1** Mediciones de la función locomotora en campo abierto del movimiento de la pata posterior izquierda y posición del tronco de ratones control y lesión de la médula espinal. Se realizó un análisis estadístico de las puntuaciones de la función locomotora en campo abierto, comparando los ratones del grupo control vs. lesión medular. Se desarrolló una prueba no paramétrica de comparación de medias entre los dos grupos, agrupando los datos en dos columnas. Y mediante la prueba U de Mann-Whitney, se apreció una diferencia altamente significativa con un valor de  $p < 0,01$  (\*\*), entre la puntuación de los animales del grupo control y los del grupo lesión, evidenciándose unas puntuaciones bajas en los animales lesionados correspondientes a ningún movimiento o movimiento moderado del tarso con la pata rotada, como consecuencia de la lesión medular temprana. (Figura 18A).

Igualmente, mediante la prueba no paramétrica de comparación de medias, U de Mann Whitney, se apreció una diferencia altamente significativa ( $p < 0,0001$  \*\*\*\*), con una reducción en la puntuación de la valoración de la posición del tronco, señalando una inclinación moderada del tronco y cola hacia abajo o paralela, en el grupo de ratones con lesión de la médula espinal (Figura 18B).

**Figura 19.** Mediciones de la función locomotora en campo abierto de ratones control vs. lesión medular 6 horas después del trauma. A) Puntuaciones del movimiento de la pata posterior izquierda durante la locomoción en campo abierto de ratones control vs. Lesión. B) Puntuaciones de la posición del tronco durante la locomoción en campo abierto de ratones control vs. Lesión.  $n=9$ ,  $p<0,05$ , datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Control (CTR); Lesión (LSN); Izquierda (IZQ).

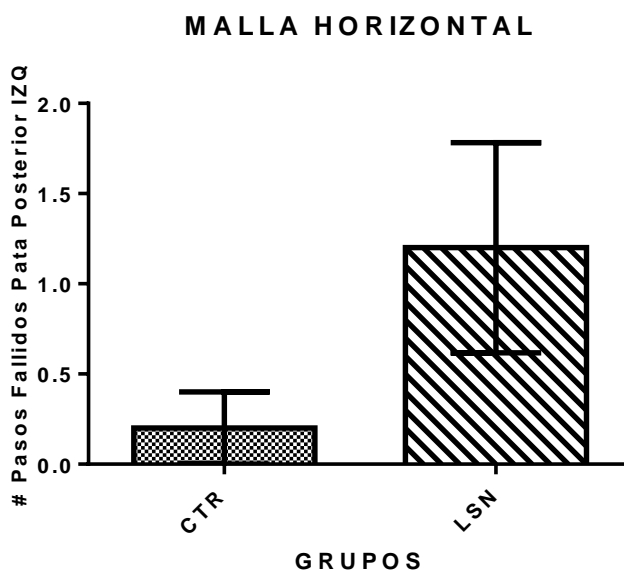


Fuente: Autor

**4.3.2** Niveles del número de pasos fallidos de la pata posterior izquierda en la malla horizontal de ratones control y lesión de la médula espinal. Para determinar la media del número de pasos fallidos, se desarrolló la prueba no paramétrica de comparación de medias entre los ratones control vs. lesión medular, 6 horas después del trauma y mediante la prueba U de Mann Whitney, no hubo diferencias. Y aunque a nivel estadístico no se evidenciaron diferencias significativas, resultado influenciado por los pocos datos obtenidos y la variabilidad en los mismos, si se apreció una tendencia de superioridad del número de pasos fallidos en el grupo de ratones sometidos a la lesión medular temprana.



**Figura 20.** Niveles del número de pasos fallidos de la pata posterior izquierda en la malla horizontal de ratones control y lesión de la médula espinal.  $n=9$ ,  $p<0,05$ , datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Control (CTR); Lesión (LSN); Izquierda (IZQ); Número (#).



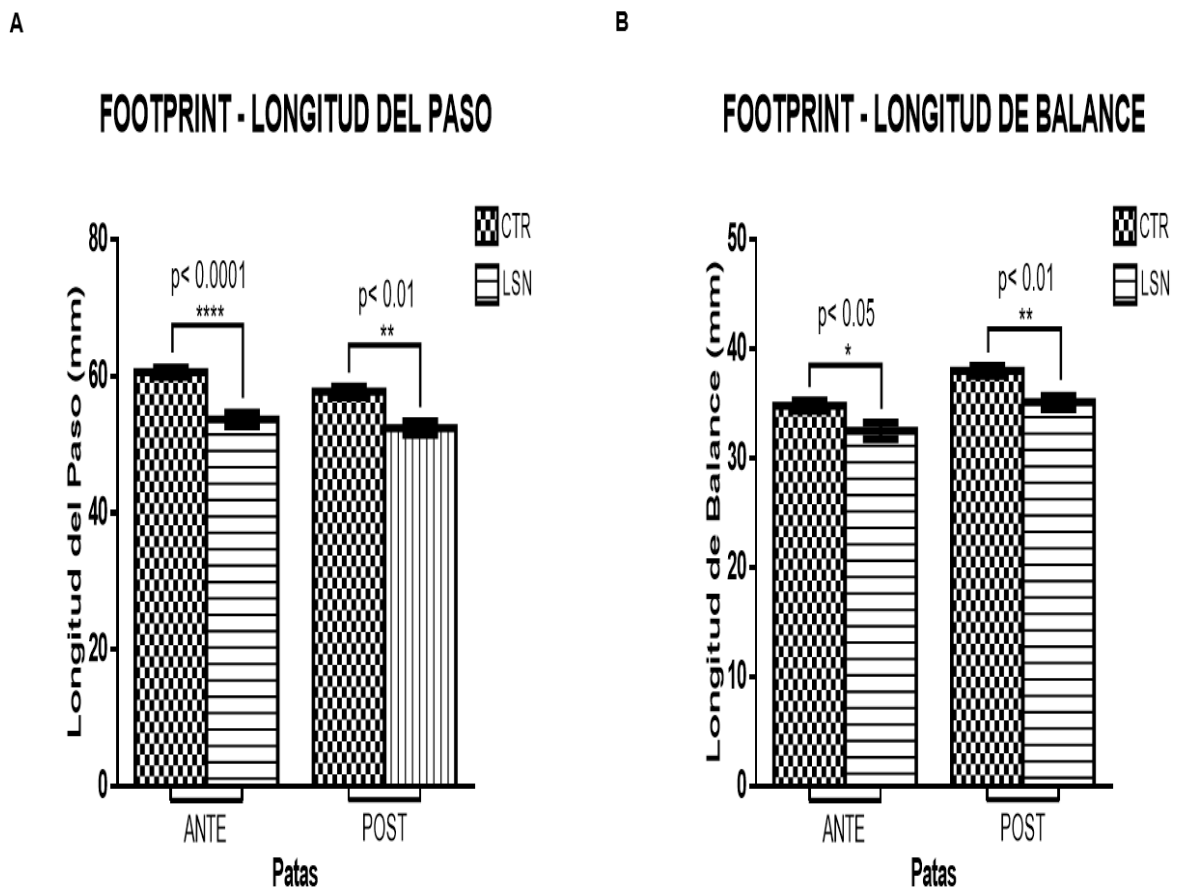
Fuente: Autor

**4.3.3** Mediciones de la función locomotora mediante un análisis de la huella (Footprint). Se detectaron las posibles diferencias en la recuperación funcional de las extremidades anteriores y posteriores mediante un análisis cuantitativo de la marcha. Se agruparon los datos de ambas extremidades, de los ratones control y lesión y al presentar los datos una distribución no paramétrica, se realizó un análisis de varianza y se aplicó comparación múltiple. Mediante Kruskal-Wallis, se observó una diferencia altamente significativa con un valor de  $p<0,0001$  \*\*\*\*, en las extremidades anteriores y un valor de  $p<0,01$ \*\*, para las extremidades posteriores, ambos con una disminución en las medidas de la longitud del paso para el grupo lesión (Figura 20A).

Igualmente, las mediciones de la longitud de balance, de las extremidades anteriores y posteriores, fue significativamente disminuida para ambas extremidades en comparación

con el grupo control, mediante la prueba no paramétrica de comparación múltiple, Kruskal-Wallis (Figura 20B).

**Figura 21.** Mediciones de la función locomotora mediante análisis de la huella de ratones control y lesión de la médula espinal 6 horas después del trauma. A) Niveles de longitud del paso del análisis de la huella de las extremidades anteriores y posteriores en ratones control y lesión. B) Niveles de longitud de balance del análisis de la huella de las extremidades anteriores y posteriores en ratones control y lesión.  $n=9$ ,  $p<0,05$ , datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Control (CTR); Lesión (LSN); Anterior (ANTE); Posterior (POST); Milímetros (mm).

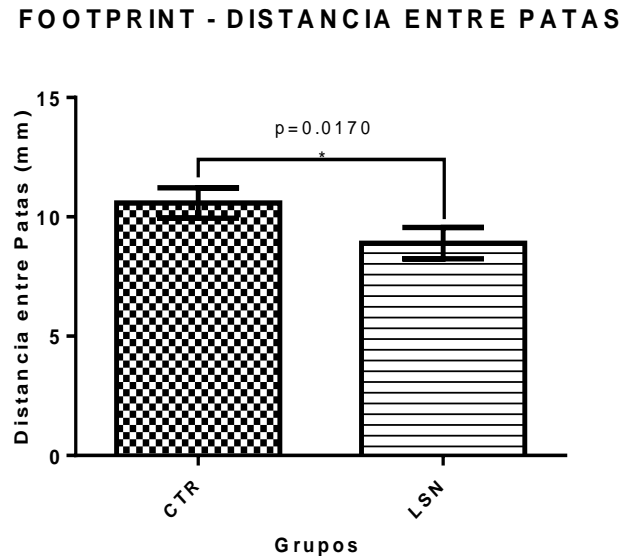


Fuente: Autor

Y las mediciones de las distancias entre las extremidades anteriores y posteriores, tuvieron una disminución en el grupo lesión, con una diferencia estadística significativa

( $p < 0,05^*$ ), mediante la prueba no paramétrica de comparación de medias U de Mann Whitney

**Figura 22.** Distancia entre extremidades anteriores y posteriores del análisis de la huella en ratones control y lesión.  $n=9$ ,  $p < 0,05$ , datos presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Control (CTR); Lesión (LSN); Milímetros (mm).



Fuente: Autor

#### 4.4 HISTOPATOLOGÍA DEL TEJIDO MEDULAR DE RATÓN LESIONADO 6 HORAS DESPUÉS DEL TRAUMA DE LA MÉDULA ESPINAL MEDIANTE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.

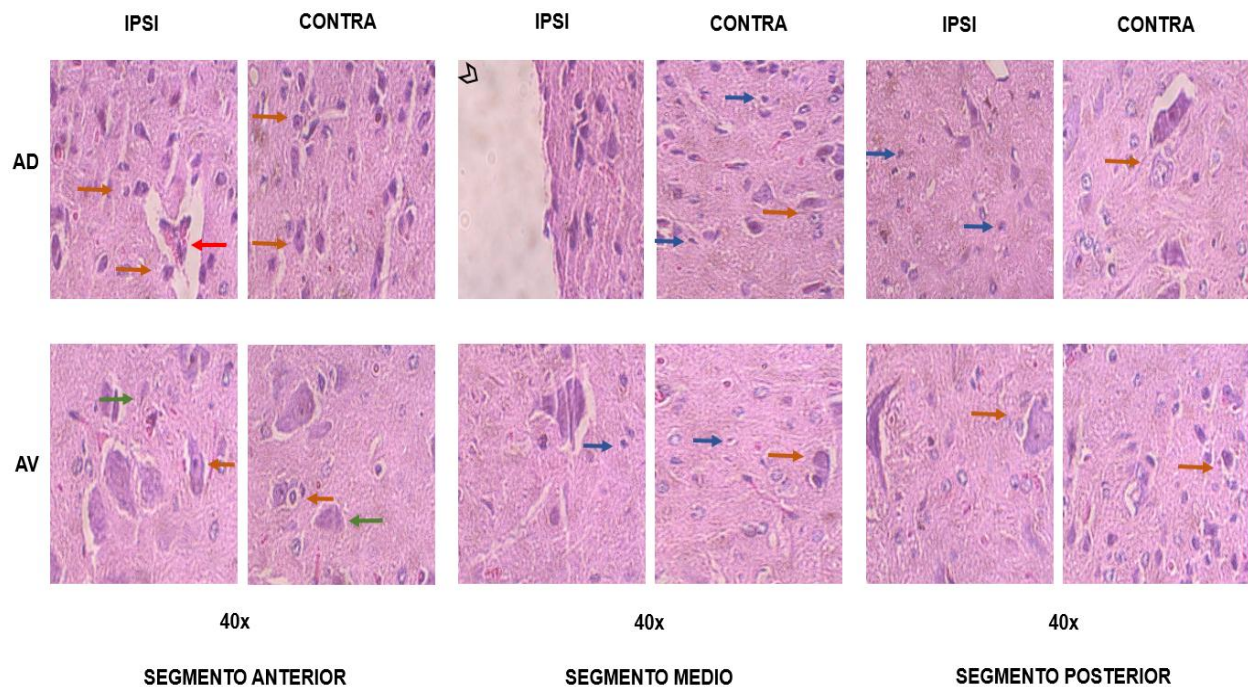
Antes de realizar los análisis de inmunofluorescencia indirecta en el tejido medular, se realizó un estudio histopatológico de las astas de la médula espinal, utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina. Las fotos analizadas se tomaron del tejido medular de un ratón lesionado 6 horas después del trauma a través del objetivo 40x y cada sección de corte coronal medular de los diferentes segmentos (anterior, medio y posterior) se dividió en las astas dorsales (AD) y astas ventrales (AV).

Y aunque las imágenes de los controles no fueron muy claras, se realizó una valoración de cada asta, dorsal y ventral, con el hemisferio contralateral (CONTRA) a la lesión.

En el asta dorsal ipsilateral (AD-IPSI), del segmento anterior, se observó edema perivascular con aumento en el espacio de Virchow, como indicativo de injuria (Flecha color rojo), acompañado de satelitosis, donde el astrocito acompaña el soma neuronal, para brindar protección y soporte (Flechas color naranja). Y el resto de las astas en este segmento presentaron satelitosis y presencia de fragmentos artefactuales (Flechas color verde).

En el segmento medio, se observó una disrupción histológica, con pérdida de continuidad del tejido medular, identificándose el epicentro de la lesión en el asta dorsal ipsilateral (AD-IPSI). Y el asta dorsal contralateral (AD-CONTRA) y las astas ventrales (AV), se caracterizaron por presentar satelitosis y marcaje de glía (Flechas color azul), como igualmente ocurrió en el segmento posterior. Además, se debe resaltar que todo aquello que no es célula, el neuropilo, se vió muy heterogéneo en todas las astas de los tres segmentos medulares analizados.

**Figura 23.** Microfotografías representativas de cortes medulares de ratón a seis (6) horas de inducida una lesión penetrante con aguja fina a nivel vertebral T9. Las imágenes corresponden al Asta Dorsal (AD) y al Asta Ventral (AV) Contralateral (CONTRA) e Ipsilateral (IPSI). Se comparan los segmentos anterior y posterior medulares con el segmento medio (epicentro) o sitio de la lesión y se aprecia pérdida de la citoarquitectura principalmente en el hemisferio espinal ipsilateral aunque el segmento contralateral también ha sido afectado. Tinción de Hematoxilina-Eosina. Magnificación 40X.



Fuente: Autor

## 5. DISCUSIÓN

A diferencia de los diversos reportes sobre biomarcadores en daño cerebral, solo unos pocos estudios han abordado el papel de los biomarcadores en pacientes con lesión medular (Pouw et al., 2009), siendo las proteínas estructurales los principales candidatos para evaluar la lesión en el tejido neural a nivel medular (Kwon et al., 2011).

La medición en sangre o LCR de proteínas específicas de origen neuronal o astrogial se considera una forma sensible para evaluar la gravedad de una lesión cerebral traumática, aunque una muestra directa del parénquima cerebral lesionado sería la única fuente de biomarcadores con información inequívoca y directa sobre los cambios que acontecen tras la lesión (Gordillo et al., 2016). La proteína enolasa específica neuronal (NSE) y la proteína ligadora de calcio, S100 $\beta$ , han llamado la atención como biomarcadores diagnósticos potencialmente útiles para la lesión cerebral, siendo biomarcadores ideales exclusivos a nivel intracelular y presentes en altas concentraciones (Cao et al., 2008).

Se decidió evaluar los niveles plasmáticos de NSE y S100 $\beta$  en ratones control y lesionados, luego de 6 horas de inducida la lesión medular. Sin embargo, varios autores han expresado que los niveles séricos de NSE y S100 $\beta$  pueden elevarse artificialmente después de un politraumatismo, hemólisis y resucitación deficiente, por lo tanto el papel de NSE y S100 $\beta$ , como marcadores de daño al tejido nervioso es cuestionable, ya que niveles séricos aumentados de ambos se pueden identificar en pacientes críticamente enfermos sin lesión cerebral (Pouw et al., 2009).

NSE, por ejemplo, inicialmente se destacó como un biomarcador de lesión cerebral ya que originalmente se creía que era estrictamente de origen neuronal; sin embargo, una investigación adicional encontró que NSE también está presente en glóbulos rojos y plaquetas disminuyendo su utilidad diagnóstica como marcador debido a la posible contaminación cruzada por hemólisis que podría ocurrir en muestras de sangre (Yokobori et al., 2015), por lo tanto, NSE tiene menos especificidad para la LM porque este

biomarcador estructural también está presente en glóbulos rojos, plaquetas sanguíneas, células plasmáticas, linfocitos, paredes capilares y células mioepiteliales, evidenciando concentraciones fisiológicamente bajas en la sangre periférica (Bogoslovsky et al., 2016). Igualmente, en un estudio que abordó la utilidad de potenciales biomarcadores séricos como medida diagnóstica en LM contusiva en ratas, mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), se observaron aumentos significativos en los niveles séricos de NSE y S100 $\beta$  a las 6 horas después de la lesión y disminuyeron significativamente 24 horas después de la misma; sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de proteína sérica total probablemente reflejando el hecho de que la albúmina, la inmunoglobulina y la transferrina constituyen aproximadamente el 80 % de las proteínas séricas de los roedores y es poco probable que cambien con la lesión (Loy et al., 2005).

Otro inconveniente relacionado con el análisis de muestras séricas para la medición de NSE, tiene que ver con el efecto del almacenamiento a largo plazo, Rundgren et al., (2014) analizaron en muestras de suero frescas y 4-7 años después de congeladas, los niveles de NSE, recogidas de pacientes con paro cardíaco tratados con hipotermia durante las primeras 72 horas. Las muestras almacenadas durante un periodo prolongado (4-7 años), mostraron un menor aumento de NSE en comparación con las muestras originales, por lo tanto el almacenamiento a largo plazo puede conducir a niveles significativamente alterados de NSE, además del efecto por el proceso de congelación-descongelación y el almacenamiento.

Por lo anteriormente expuesto, el estudio de biomarcadores en sangre es desafiante y posiblemente se deba a las bajas concentraciones de ciertas proteínas de interés, su degradación proteolítica, eliminación del plasma a través del hígado o el riñón, unión a proteínas transportadoras y quizá por la permeabilidad variable de la barrera hematoencefálica a la difusión de estas proteínas. Es importante además tener en cuenta que la baja sensibilidad de los ensayos en plasma puede dificultar su precisión diagnóstica (Bogoslovsky et al., 2016).

Bueno et al (2011), revisaron el plasma de pacientes con síndrome coronario agudo, describiendo una dificultad para la detección de proteínas minoritarias, dificultades asociadas a la determinación de su proteoma, contando con la presencia de proteínas como inmunoglobulinas y albúmina que representan aproximadamente el 70% del contenido proteico total del plasma; además, la albúmina puede actuar como transportadora de otras proteínas y moléculas de interés diagnóstico y biomédico, tales como citoquinas y quimioquinas. Aunque se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de diversos métodos para retirar las proteínas abundantes del plasma, se ha comprobado que la albúmina presenta múltiples sitios de unión a proteínas y metabolitos, lo cual sugiere que al retirarla del plasma, también se están perdiendo proteínas minoritarias.

Es posible que en el presente estudio, las bandas identificadas como S100 $\beta$ , fueran observadas luego de la quimioluminiscencia (datos no mostrados), gracias al tratamiento previo del plasma en el cual se precipitaron la albúmina y quizá otras proteínas interferentes; sin embargo, los datos obtenidos fueron bastante variables por lo cual la técnica de extracción mediante precipitación y ultracentrifugación requiere ser estandarizada y depurada para estudios de proteínas ligeras mediante Western blot.

Igualmente, los presentes resultados, sugieren que ambas proteínas no se liberan tan temprano en las muestras de plasma sanguíneo, siendo quizás probadas como biomarcadores de lesión medular en la etapa aguda temprana, luego de 24 horas en el plasma sanguíneo.

Un nuevo enfoque para evaluar el grado de daño de la médula espinal en la fase aguda es la medición de proteínas neurales específicas dentro del líquido cefalorraquídeo (LCR). El traumatismo en la médula espinal provoca una alteración aguda del parénquima de la médula, seguida de una degeneración axonal secundaria y consecuentemente la muerte de células nerviosas por apoptosis o necrosis, procesos que pueden durar de días a semanas. Como la médula espinal está rodeada de este fluido, el daño a la médula libera proteínas y metabolitos del tejido nervioso hacia el LCR



y ya que este se encuentra más próximo a la zona lesionada, sus determinaciones no se ven condicionadas por la integridad de la barrera hematoencefálica. Y aunque se han publicado varios estudios sobre el uso de biomarcadores en el LCR de pacientes con lesión cerebral traumática, existen pocos estudios en el campo de la LM (Gordillo et al., 2016; Pouw et al., 2014)

Después de realizar varios ensayos para la obtención del líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante punción de la cisterna magna (Liu & Duff, 2008) en ratones control y lesionados, luego de 6 horas del procedimiento quirúrgico, no fue posible obtener muestras suficientes y adecuadas para el análisis de inmunoblot, por lo que se decidió no continuar con el estudio de las proteínas NSE y S100 $\beta$  en el LCR, considerando la dificultad para obtener este fluido y el poco volumen de muestra obtenida, que en algunos casos se contaminó con sangre. Estas dificultades evitaron un análisis objetivo y concluyente mediante el análisis de Western blot de muestras individuales para determinar el grado de variabilidad de los niveles de ambas proteínas después de la lesión medular en ratones.

Por su parte Pouw et al., (2014) determinaron las concentraciones de las proteínas ácida fibrilar glial (GFAP), NSE, S100 $\beta$ , tau y de neurofilamentos (NFH), en el LCR, mediante ELISA, 24 horas después de una LM y su correlación con la lesión neurológica. Las concentraciones en LCR de todas las proteínas examinadas se elevaron en los pacientes con LM en comparación con los controles no lesionados independientemente de la gravedad neurológica.

Igualmente Lubieniecka et al (2011), identificaron biomarcadores en el LCR que pueden evaluarse para la caracterización de la gravedad del daño mecánico primario en la LM por contusión en ratas después de 24 horas del trauma, mediante análisis de western blot. Se demostró que la cantidad limitada de LCR obtenida de una sola rata evitó el análisis de muestras individuales de LCR para determinar los niveles de proteínas después de la lesión. Otra limitación del estudio fue la presencia de un único punto de tiempo para la recolección de LCR después de la lesión medular, por lo cual, la inclusión

de otros tiempos adicionales proporcionaría mayor información sobre el papel de marcadores identificables en el daño medular secundario. Además, dada la patología compleja y dinámica de la LM, se puede esperar que los niveles de biomarcadores de daño de la médula espinal dependerán del tiempo, y por lo tanto, una evaluación precisa de la gravedad de la lesión requerirá un marcador que se modifique durante la fase aguda de la LM.

En contraste con la lesión cerebral traumática aguda, poco se ha estudiado en los biomarcadores del LCR para lesiones agudas y traumáticas de la médula espinal. La razón está en gran medida relacionada con la accesibilidad al muestreo de LCR. Los pacientes con lesiones cerebrales traumáticas a menudo tienen monitorización de la presión intracraneal a través de drenajes extraventriculares, siendo factible tomar muestras de LCR para su análisis; sin embargo, esta monitorización no se realiza en pacientes con lesiones traumáticas de la médula espinal, lo que hace más difícil obtener tales muestras de fluido. Mientras que la realización de una punción lumbar para obtener una muestra de LCR puede ser relativamente fácil en el entorno ambulatorio para pacientes con enfermedades neurodegenerativas crónicas, lo que ocurre en un paciente con LM aguda con una columna cervical o toracolumbar dislocada y numerosas otras lesiones puede ser difícil (Kwon et al., 2011).

En otros estudios, se concluye sobre la limitante en la toma de muestras de LCR y su limitado uso clínico, particularmente en pacientes con lesión de la médula espinal (Ma, Novikov, Karlsson, Kellerth, & Wiberg, 2001). No obstante, es posible que mediante técnicas más específicas, tales como ELISA y espectometría de masas se puedan detectar niveles de las proteínas en estudio en un mínimo volumen a analizar, de tal manera, que el LCR pueda a futuro ser retomado como material de estudio.

Así como en el cerebro, los datos de Loy et al (2005) indican que estos biomarcadores (NSE y S100 $\beta$ ) pueden ser útiles herramientas para evaluar el daño experimental en la médula espinal en fase aguda. En el presente estudio se obtuvieron diferencias altamente significativas entre los individuos del grupo control y lesionados en cuanto a la

modulación de NSE disminuyendo sus niveles (Figura 15) mas no en la modulación de la proteína S100 $\beta$  (Figura 17), aunque para ambos casos, independientemente del segmento medular analizado (anterior, medio y posterior). A pesar que no se evidenciaron diferencias en la modulación de la proteína S100 $\beta$  a nivel estadístico, se puede deducir que la respuesta astrocítica fue mínima, siendo tal vez producto de la laceración puntual medular producida en el presente estudio, siendo quizás detectable a un tiempo mayor de inducida la lesión, aunque se observó una tendencia de incremento de la proteína en el epicentro de la lesión (MMLSN), en comparación a los otros segmentos medulares (Figura 18). Se observó también, una disminución atípica en la modulación de la proteína en el segmento medular anterior lesionado (MALSN), justificado por una pérdida de tejido y de proteína estructural. En concepto del autor, es el primer hallazgo de la modulación de ambas proteínas a nivel de tejido nervioso en lesión medular traumática aguda.

La liberación de estas proteínas desde el interior hacia el espacio extracelular, está relacionada con daños estructurales de las células residentes del sistema nervioso que permite la salida del contenido intracelular. Una alteración mecánica de la médula espinal provoca un daño instantáneo de las células neuronales y gliales y de la barrera hematoencefálica; así, el nivel extracelular de estas proteínas y el tiempo de aparición en el espacio extracelular pueden ser empleados como biomarcadores de lesión tisular (Cao et al., 2008; Ma et al., 2001).

NSE es una proteína citosólica que participa en el transporte axonal y sus niveles de expresión fluctúan dependiendo de la demanda de energía dentro de una célula. Esta proteína normalmente no es liberada por neuronas intactas al espacio extracelular; sin embargo, cuando hay daño axonal, NSE se regula para mantener la homeostasis celular, siendo un marcador que permite evaluar directamente el daño funcional a las neuronas (Kawata et al., 2016; Yokobori et al., 2015), disminuyendo sus niveles de expresión.

S100 $\beta$  es una proteína intracelular de células astrogliales y células de Schwann, que puede ser liberada al espacio extracelular, siendo neuroprotectora y neurotrófica a bajas

concentraciones, pero tóxica y pro-apoptótica en altas concentraciones. Tras una lesión tisular, S100 $\beta$  se puede asociar a una proteína de daño (DAMP) alarmina, conformando una señal de peligro capaz de activar células del sistema inmune innato, manteniendo la inflamación a través de la activación de los macrófagos/microglía en una concentración alta en los sitios de lesión (Kawata et al., 2016; Sorci et al., 2010).

En un modelo de lesión medular, Cao et al., (2008) demostraron una expresión significativamente alta de las proteínas NSE y S100 $\beta$  en suero y LCR, comparadas con el grupo control, a las 6 horas posteriores a la lesión medular, mediante pruebas de ELISA, no obstante, dichas diferencias no fueron evidentes a los 30 minutos. Este mismo comportamiento de expresión a las 6 horas fue demostrado por Loy et al., (2005). Por su parte, Lubieneka et al., (2011) evaluaron los niveles de las proteínas NSE y S100 $\beta$  en LCR posterior al daño mecánico primario de LM por contusión, en ratas durante las primeras 24 horas en ELISA, sin encontrar diferencias significativas, posiblemente por el pico de expresión a las 6 horas y la disminución progresiva a niveles basales.

Sin embargo, en lesiones espinales extradurales con contusión medular de origen metastático e infeccioso en conejos, con repetición de daño a la semana si no se evidenciaba parálisis, se evaluaron los niveles séricos de NSE y S100 $\beta$ , demostrando una liberación prolongada de S100 $\beta$  posterior a la destrucción celular progresiva, sin cambios en los niveles de NSE a las 2 semanas del procedimiento quirúrgico, cuestionando el valor predictivo de esta última como marcador bioquímico para estas lesiones (Marquardt et al., 2011).

En otra investigación similar de Wolf et al., (2014) en la que se tenía como objetivo evaluar los posibles cambios en los niveles séricos de NSE y S100 $\beta$  después de fracturas vertebrales y de LM dentro de las 24 horas, mediante ELISA. El análisis no identificó diferencias significativas en los niveles de NSE entre los pacientes con fracturas de la columna vertebral y los pacientes sin lesión de la columna vertebral, aunque se encontró una diferencia significativa en los niveles séricos de S100 $\beta$ . Siendo éste, el primer estudio que confirma los resultados de Marquardt (2011), es decir, que sólo los niveles de S100 $\beta$

estaban significativamente correlacionados con fracturas vertebrales agudas y lesiones de la médula espinal. La medición de NSE no tuvo significación pronóstica. La limitación de este estudio se debe al bajo número de pacientes incluidos en cada grupo (Wolf et al., 2014).

Li et al (2014), evaluaron la función de la NSE y su asociación con los mecanismos moleculares subyacentes a la lesión del SNC, en un modelo de contusión mediante inmunoblot, en donde la expresión de NSE aumentó notablemente después de la LM, alcanzando su punto máximo en el día 5. Estos datos indicaron que el nivel de NSE tuvo un cambio temporal después de la LM; el metabolismo energético celular fue cambiado como resultado de la isquemia y la hipoxia en el sitio de la lesión. La NSE puede participar en el proceso de glucólisis después de la LM como una enzima clave de este proceso bioquímico (Li et al., 2014).

Por otra parte, se ha demostrado expresión bimodal de la S100 $\beta$  ante la compresión medular en ratas, con diferentes tiempos de expresión. El patrón temporal de las concentraciones séricas de S100 $\beta$  mostró tres picos, el primer pico ocurrió a las tres horas, después de los cuales los valores disminuyeron significativamente, después de seis horas, las concentraciones aumentaron de nuevo y alcanzaron un segundo pico a las 12 horas y el tercer pico se produjo a los tres días del postoperatorio; sin embargo, el grupo de simulación (solo con laminectomía en región sacra) también tuvo un ligero aumento en S100 $\beta$  inmediatamente después de la operación y luego un descenso gradual hasta tres días después de la operación (Ma et al., 2001).

En un estudio que determinó los niveles séricos de S100 $\beta$  a las 6 horas en pacientes con fractura espinal, se investigó si S100 $\beta$  proporcionaba información útil para predecir la fractura espinal y la lesión medular en pacientes traumatizados sin lesiones en la cabeza. Se encontró que S100 $\beta$  se incrementó a partir de fracturas vertebrales en pacientes sin lesión de la médula espinal y luego se incrementó más en aquellos con fracturas vertebrales con lesión de la médula espinal; sin embargo, estos resultados no pueden

aplicarse en un entorno clínico debido a que la población de estudio fue muy pequeña (Lee et al., 2010)

Chen et al., (2010), mediante análisis de electroforesis en gel 1D y 2D (bidimensional), investigaron los cambios relacionados con la lesión medular en el proteoma y fosfoproteoma de la médula espinal en ratas 24 horas después de una contusión moderada, argumentando la presencia de tres enzimas glucolíticas que se regularon diferencialmente en las primeras 24 horas de la LM. El análisis 2D reveló que la abundancia de NSE de sus isoformas  $\alpha$  y  $\gamma$ , disminuyó significativamente a las 24 horas después de la lesión medular. Un doblete de bandas positivas de NSE se identificó mediante WB aproximadamente a 50 kDa y puede representar la banda  $\alpha$  (banda inferior) y  $\gamma$  (banda más alta) con pesos moleculares de 47 y 48 kDa respectivamente. Los volúmenes de ambas bandas positivas de NSE tendieron a disminuir después de la lesión, pero el efecto fue estadísticamente significativo solo para la banda de mayor peso molecular.

La lesión traumática de la médula espinal causa un daño significativo a la vasculatura en el sitio del impacto, causando la extravasación de sangre en el tejido de la médula espinal. Las células y sus procesos en el sitio de impacto se destruyeron, lo que inicio una cascada de eventos que causaron la disfunción celular adicional y la muerte que se extendió distalmente desde el sitio de la lesión. Se sabe que la función mitocondrial y el metabolismo energético se deterioran después de la LM. Tres enzimas glucolíticas se alteraron diferencialmente a las 24 h después de la LME: la abundancia de  $\alpha$ - y  $\gamma$  enolasa disminuyó, la abundancia de trifosfato isomerasa aumentó y la fosforilación de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa aumentó, informando que en otras investigaciones NSE derivada de neuronas y la creatina quinasa tipo B se escapan de las neuronas al suero y al LCR, respectivamente, después de la lesión del SNC, lo que disminuiría las concentraciones tisulares de estas enzimas. Siendo este estudio correspondiente con nuestros resultados sobre la reducción en los niveles de la proteína NSE mediante Western blot, en tejido medular.

No obstante, es factible argumentar en los presentes resultados, un claro efecto de la lesión medular sobre la reducción en los niveles de la proteína NSE, mostrando ser un biomarcador sensible, como consecuencia de daño y muerte celular (soma-axón) en el foco de la lesión y en la zona circundante inmediata, aún a pocas horas de ocurrido el evento lesivo (6 horas después del trauma), como deduce Cao et al., (2008), el pico en la concentración de NSE y S100 $\beta$  en suero y LCR después de las 6 horas refleja una disrupción mecánica de la médula espinal, sugiriendo que ambos biomarcadores reflejan un daño neuronal y glial inducido durante la fase aguda de la LM y sugiere que pueden ser utilizados como biomarcadores específicos para la fase aguda de la LM.

Ma et al., (2001), al realizar una lesión por contusión en la médula espinal en ratas, también deduce que provoca un daño mecánico instantáneo de las células neuronales y gliales, explicando el efecto del primer pico de la proteína S100 $\beta$  tres horas después de la lesión.

El marcaje observado en los experimentos previos de inmunofluorescencia indirecta, del presente estudio, con cortes medulares fue inespecífico, ya que, la señal celular con ambos marcadores (NSE y S100 $\beta$ ), fue muy débil, aun a las altas concentraciones utilizadas de los anticuerpos (1:500; 1:250, respectivamente), y esto no permitió diferenciar la señal del fondo de la placa, por lo cual no se observaron diferencias en el tenue marcaje de las proteínas NSE y S100 $\beta$ , en los cortes medulares tanto de ratones control como lesión, 6 horas después del trauma mediante inmunofluorescencia indirecta.

Contrario a Li et al., (2014), quienes mediante una contusión medular en ratones, lograron una mayor comprensión de la función fisiológica de la proteína NSE y su asociación con los mecanismos moleculares subyacentes a la lesión medular y su reparación. Evaluaron el día 5 como la máxima expresión proteica de NSE después de la lesión, a través de inmunofluorescencia indirecta, observando expresión de la proteína NSE del grupo control, en la sustancia gris y blanca, incluyendo neuronas y varios tipos de células gliales. Y el marcaje de la proteína NSE en astrocitos y microglía aumentó después de la lesión, en comparación con los controles. Igualmente la expresión y

actividad de la proteína NSE, se evaluó en ratas, tras una contusión medular y el tratamiento de las ratas con ENOblock, un inhibidor único de moléculas pequeñas de las funciones no glucolíticas de NSE, redujó notablemente la expresión de NSE en el tejido medular lesionado en comparación con los controles, mediante inmunofluorescencia indirecta (Haque et al., 2017).

Y Do Carmo et al., (2007), mediante inmunohistoquímica convencional y análisis semi-cuantitativo de imágenes morfométricas y microdensitométricas, caracterizaron los cambios de la proteína S100 $\beta$  en astrocitos reactivos y microglía, después de una lesión medular por contusión en ratas. Se observaron perfiles inmunorreactivos de S100 $\beta$ , parecidos a astrocitos quiescentes con un tamaño pequeño, distribuidos en la sustancia gris y blanca en las ratas no lesionadas.

Y como resultados adicionales mediante los estudios histopatológicos utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina, fue posible evidenciar el epicentro de la lesión, con una disrupción histológica y pérdida de la continuidad del tejido medular (Figura 23). Apreciándose, además, satelitosis, y un aumento en el espacio de Virchow, como indicativo de daño medular.

Después de la lesión de la médula espinal del ratón, las células proliferan en el área lesionada, manteniendo los extremos opuestos de la médula espinal transectada en contacto, y típicamente no hay formación de quistes llenos de líquido. Incluso hay reportes que sugieren que se produce un grado modesto de regeneración después de una sección completa de la médula espinal del ratón. En cambio, tanto en ratas como en humanos, es común el desarrollo de quistes craneales y caudales al sitio de la lesión. La formación temprana de tejido fibroso en el núcleo de la lesión en ratas y humanos se asocia típicamente con una ruptura de las tres meninges, lo que permite que los fibroblastos invadan el sitio de la lesión (Kjell & Olson, 2016).

Mediante una contusión medular en T9 en ratones Balb/C, se examinaron los cambios histopatológicos a los 7, 14 y 28 días después del procedimiento quirúrgico. Las



secciones transversales a través de la médula espinal revelaron la mayor área de daño tisular cerca del centro del sitio del impacto, con regiones de daño localizadas centralmente y un borde residual de la sustancia blanca. Se presentaron quistes dentro de la lesión y el tejido dañado en las regiones cercanas y en todos los tiempos de evaluación, el sitio de la lesión se llenó con una matriz extracelular compacta con grandes grupos de células mononucleares y ocasionalmente vasos sanguíneos agrandados (Jakeman et al., 2000).

Byrnes, Fricke, & Faden., (2010), utilizaron dos protocolos de resonancia magnética, con y sin contraste, para demostrar diferencias patológicas entre ratas sprague-dawley y ratones C57B16 después de una lesión medular, sacrificados a los 28 días. Los ratones típicamente mostraron acumulación de un tejido conectivo fibroso denso que llenaba el sitio de la lesión, en tanto en ratas se observaron grandes cavidades quísticas que se extendieron rostrales y caudales al sitio de lesión inicial. Las similitudes se basaron en el momento de los eventos de reorganización celular; las dos especies demostraron una actividad inflamatoria y astrogial similar, dando lugar a formación de cicatrices gliales y daño de tejido secundario alrededor del sitio de la lesión.

En el presente estudio, se realizaron varios ensayos de métodos quirúrgicos para la lesión medular en ratones, y durante la compresión medular, inicialmente postulada como patrón de daño medular para el presente estudio, se presentó una alta variabilidad y mortalidad de unidades experimentales, por lo cual se decidió cambiar el modelo de técnica quirúrgica, dejando la compresión medular por medio de pinzas y reemplazándola por una lesión medular unilateral mediante punción transmedular con aguja hipodérmica calibre 23.

Varios modelos de lesión medular se han creado para imitar la lesión de la médula espinal en pacientes y para estudiar los efectos de los tratamientos experimentales. En estos modelos, las lesiones medulares fueron infligidas por contusiones, compresiones o transecciones completas e incompletas. Las lesiones por contusión tienen un interés clínico especial, ya que las lesiones resultantes se asemejan a las encontradas en

muchos pacientes con lesión medular; sin embargo, las contusiones generalmente crean una necrosis central de la sustancia gris y afectan los tractos nerviosos de la sustancia blanca en grado variable, haciendo difícil el estudio de los efectos específicos de la lesión (Schucht et al., 2002). Así mismo, Blanco et al., (2015) usaron clips vasculares para la compresión medular previa laminectomía completa, requerida para poder pasar la rama ventral del clip. Esto causó una desestabilización grave de la columna que después se reflejó en complicaciones motoras no necesariamente atribuibles a la lesión neuronal.

Por otra parte, una transección microquirúrgica incompleta de la médula espinal, interrumpe un grupo de vías definidas, facilitando así el estudio de su fisiopatología o la respuesta a un tratamiento de regeneración. El tracto corticospinal es frecuentemente lesionado en estos estudios, ya que es fácil de localizar y se extiende en un haz focal en el tronco cerebral ventral y la médula espinal dorsal. Una lesión en este tracto sólo da lugar a déficits menores en la capacidad locomotora, por lo que los animales lesionados se recuperan fácilmente (Schucht et al., 2002).

Por lo anterior, los modelos de transección se usan para estudiar el papel de los circuitos neuronales en la locomoción. No obstante, las médulas espinales transectadas rara vez se encuentran en la práctica clínica y, por lo tanto, los modelos de transección no reflejan realmente la fisiopatología de la LM y no son apropiados como base para probar el tratamiento neuroprotector. La transección de la médula espinal se realiza, para mantener la continuidad del tejido, para que el investigador pueda interrumpir las vías seleccionadas. Dado que una transección completa hace un medio tisular tan destructivo, es más apropiada la transección incompleta que reduce el daño físico a la médula. Se puede realizar una hemisección dorsal para la interrupción selectiva del tracto corticoespinal con cambio en la textura y el color entre la materia blanca y gris, dando una indicación del grado de hemisección (Sharif et al., 2017).

La hemisección dorsal unilateral ocasionada con aguja fina, en el presente estudio, generó cambios menos dramáticos en la citoarquitectura, pero suficientes para generar modificaciones en la función locomotora. Como se observó en los presentes resultados,

las puntuaciones de la función locomotora en campo abierto, tuvieron una disminución significativa en los ratones lesionados a 6 horas del trauma medular, indicando cambios moderados en el movimiento del tarso y rotación de la pata posterior izquierda e inclinación moderada del tronco y posición de la cola hacia abajo, arriba o paralela (Figura 19). Similar, a lo descrito por Basso et al., (2006), que determinaron las fases en la recuperación locomotora en diferentes cepas de ratón, tras una lesión medular contusiva, utilizando la escala de puntuación de BMS. Los ratones demostraron hasta tres fases de recuperación locomotora dependiendo de la gravedad de la lesión. La primera fase se caracterizó por un periodo de parálisis, en la que solo se produjeron movimientos de articulación aislados por debajo del nivel de la lesión, en la segunda fase, la colocación plantar y el soporte de peso, fue seguido por un escalonamiento plantar y en la tercera fase, las mejoras en los detalles finos de la locomoción como la coordinación y la posición de la pata fueron evidentes.

Además, de los ratones en estudio, pocos alcanzaron la posición normal de la cola. La capacidad de mantener la posición normal de la cola durante la prueba fue rara, incluso para el grupo de lesión más leve, lo que sugiere que el control de la cola es una de las características locomotoras más difíciles y últimas para recuperarse (Basso et al., 2006). Estudio correspondiente, con Jakeman et al., (2000), quienes tras una adaptación de un dispositivo de lesión electromagnética para producir una lesión medular por contusión en ratones, observaron que la lesión produjo parálisis en las extremidades posteriores, con ligeros movimientos de las articulaciones en algunos animales, 1 día después de la lesión, sin embargo, no se identificó ninguna diferencia en la puntuación BMS, entre los grupos de lesión, siendo un reflejo de la variabilidad de las puntuaciones al día 1 después de la lesión.

Y la incorporación de la caminata sobre la malla horizontal y el análisis de la huella, se utilizaron para evaluar mejor las diferencias entre los rangos de la puntuación de la locomoción en campo abierto, en los ratones control y lesión, como medidas de resultados adicionales, para distinguir con mayor precisión las diferencias sutiles en la función locomotora de las extremidades posteriores. Evidenciándose en los presentes

resultados, en las mediciones del análisis de la huella, para ambas extremidades, una disminución significativa en todas las longitudes de los parámetros evaluados, en el grupo lesión (Figuras 21, 22), como de igual forma, se observó un aumento del número de pasos fallidos de la pata posterior izquierda en el grupo lesión, a tan solo 6 horas de ocurrido el evento lesivo (Figura 20).

Similar a lo descrito por Matyas et al., (2017), quienes tras una lesión medular contusiva en ratones, mediante Catwalk, detectaron diferencias significativas en la función motora y coordinación. La longitud del paso, aproximadamente de 6 cm en animales sanos, se redujo significativamente en todos los ratones lesionados en comparación con los controles. Y la distancia entre las patas anteriores y posteriores aumentó en los animales lesionados. Igualmente Ma et al., (2001), mediante un modelo de lesión medular por contusión en ratones, con un dispositivo electromagnético, correlacionaron las medidas de comportamiento con la gravedad de la lesión, observando una disminución significativa de las medidas de la longitud de balance, en los grupos lesión, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos lesión, sugiriendo que esta medida no depende de la gravedad de la misma. Este hallazgo ilustra la sensibilidad del análisis de la huella para detectar déficits después de una lesión medular leve, que no fueron detectados durante la locomoción en campo abierto.

Y en la caminata sobre la malla horizontal, cuando los ratones mostraron una puntuación de recuperación durante la locomoción en campo abierto, en el grupo lesión, las fallas fueron significativamente superiores a los 14, 31, 42 y 63 días, sin cambiar con el tiempo, indicando que esta prueba es sensible a pequeños déficits después de la lesión medular, estando el desempeño de esta prueba relacionada con la función de las vías propioespinales, corticoespinales y rubroespinales (Ma et al., 2001). En concordancia con los resultados descritos por Jin et al., (2013), quienes tras realizar una contusión medular en ratas, observaron que en la malla horizontal, la contusión leve, resultó en una disminución de la colocación correcta de la pata posterior aproximadamente en un 80%, tres semanas después de la lesión.

Y Hill et al., (2009), identificó los perfiles de recuperación de los déficits sensoriales y motores, para cada nivel de severidad de lesión de la médula espinal, en ratones, mediante hemisección. Anticipando que este modelo exhibiría un menor grado de daño secundario al inducir menos edema y destrucción del tejido. Los grupos lesión de 0,8 y 1,1 mm tuvieron reducciones significativas en las medias de sus longitudes del paso y de balance, correlacionándose significativamente con la cantidad de tejido intacto en las astas ventrales. Los diversos grados de déficit observados, sugieren una plasticidad espinal por debajo del nivel de la lesión que contribuye a la recuperación de la función locomotora de la extremidad posterior. Un posible mecanismo para esta recuperación espontánea de la función puede ser una reorganización de los circuitos debajo de la lesión, compensando así la pérdida de tractos ascendentes y descendentes.

Las correlaciones anatómicas de la función locomotora después de las lesiones dorsales y ventrales de la médula espinal en los ratones, demostraron que el tracto reticuloespinal, es de suma importancia para la locomoción en campo abierto y la colocación externa de la pata y el aumento de la puntuación de la base de apoyo, son probablemente el resultado de los daños a los tractos rubroespinal y/o vestibuloespinal, mientras que los tractos coritcoespinal y rubroespinal, son necesarios para la locomoción en la malla (Hill et al., 2009).

## 6. CONCLUSIONES

- En las muestras de plasma sanguíneo no se detectaron niveles de la proteína NSE y de la proteína S100 $\beta$  en fase aguda (seis horas post-lesión) en el modelo murino de trauma medular mediante la técnica de Western blot.
- No fue factible identificar los niveles de las proteínas NSE y S100 $\beta$  en el LCR de ratones control y lesionados luego de 6 horas de inducida la lesión medular mediante la técnica propuesta de Western blot.
- A 6 horas de inducida la LM en ratones, los niveles de la proteína NSE en el tejido medular lesionado se redujeron significativamente en comparación con los animales del grupo control, mediante Western blot, lo cual puede indicar una caída importante de ésta proteína por muerte o daño neuronal en la etapa temprana de la lesión.
- Los niveles de la proteína S100 $\beta$  no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos (control vs. Lesión), mediante Western blot, lo cual indicó que en la fase aguda a escasas seis horas de la LM, aún no se incrementó la liberación de esta proteína a nivel medular por parte de los astrocitos reactivos, siendo quizá detectable a un tiempo mayor de inducida la lesión.
- En el presente estudio, el marcaje de las proteínas NSE y S100 $\beta$  mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta no fue específico, ya que no se presentaron diferencias entre los animales control vs. Lesión medular.

## RECOMENDACIONES

Es posible que mediante técnicas más específicas, tales como ELISA y espectometría de masas, se puedan detectar niveles de las proteínas en estudio, de tal manera, que el LCR y el plasma sanguíneo o suero puedan a futuro ser retomados como material de estudio, no solo a 6 horas sino a diferentes tiempos de ocurrida la lesión medular.

Además de la precipitación con acetona, se podría mejorar la eliminación de proteínas mayoritarias interferentes del plasma sanguíneo, como la albumina y gamma globulinas mediante la ultracentrifugación a 2°C - 15.000 r.p.m., y filtración con filtros de 0,45µm Ø.

Así mismo, se podría plantear el aumento del número de réplicas de los datos experimentales para analizar ambas proteínas, obteniendo un mayor número de datos sin modificar el tamaño muestral.

Se deben considerar nuevos candidatos de biomarcadores que reflejen un daño neuronal y glial para evaluar los cambios que acontecen tras la lesión medular no solo en su fase aguda, sino también en el daño medular secundario, mediante la inclusión de puntos de tiempo adicionales que proporcionen más información sobre la LM, como por ejemplo, productos de degradación de  $\alpha$ II-espectrina (SBDPs) y neurofilamento hiperfosforilado (pNF-H).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, J., Varón, L., Berbeo, M., Feo, O., & Díaz, R. (2008). Avances fisiopatológicos para el entendimiento de la lesión medular traumática . Revisión bibliográfica. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, 22, 272–281.
- Basso, D., Fisher, L., Anderson, A., Jakeman, L., Tigue, D., & Popovich, P. (2006). Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains. *Journal of Neurotrauma*, 23(5), 635–659.
- Bican, O., Minagar, A., & Pruitt, A. (2013). The Spinal Cord. A Review of Functional Neuroanatomy. *Neurologic Clinics*, 31(1), 1–18.
- Blanco, C., Marín, E., Vidal, R., Calaudi, P., Sánchez, G., Consejero, E., & Pellegrino, F. (2015). Modelo de lesión medular aguda en ratas. *Neurología*, 21–30.
- Bogoslovsky, T., Gill, J., Jeromin, A., Davis, C., & Diaz, R. (2016). Fluid Biomarkers of Traumatic Brain Injury and Intended Context of Use. *Diagnostics*, 6(37), 1–22.
- Bueno, Y., Muñoz, G., & Torres, R. (2011). Implementación de técnicas sencillas de remoción de proteínas mayoritarias de plasma sanguíneo para análisis por electroforesis bidimensional (2D). *Revista Colombiana de Química*, 40(2), 131–148.
- Byrnes, K., Fricke, S., & Faden, A. (2010). Neuropathological differences between rats and mice after spinal cord injury. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 32(4), 836–846.
- Cao, F., Yang, X., Liu, W., Hu, W., Li, G., Zheng, X., ... Lv, S. (2008). Elevation of neuron-specific enolase and S-100B protein level in experimental acute spinal cord injury. *Journal of Clinical Neuroscience*, 15(5), 541–544.
- Carvajal, C., Pacheco, C., Gómez-Rojo, C., Calderón, J., Cadavid, C., & Jaimes, F. (2015). Características clínicas y demográficas de pacientes con trauma raquimedular. Experiencia de seis años. *Acta Médica Colombiana*, 40(1), 45–50.
- Chen, A., McEwen, M., Sun, S., Ravikumar, R., & Springer, J. (2010). Proteomic and phosphoproteomic analyses of the soluble fraction following acute spinal cord contusion in rats. *Journal of Neurotrauma*, 27(1), 263–274.
- Clark, J., Gebhart, G., Gonder, J., Keeling, M., & Kohn, D. (1997). The 1996 Guide for



- the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR Journal*, 38(1), 41–48.
- Cruz, C., Coelho, A., Antunes, T., & Cruz, F. (2015). Biomarkers of spinal cord injury and ensuing bladder dysfunction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 82, 153–159.
- Diaz, E., & Morales, H. (2016). Spinal Cord Anatomy and Clinical Syndromes. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 37(5), 360–371.
- Do Carmo, J., De Freitas, B., De Luca, B., DeAndrade, M., Gomide, V., & Chadi, G. (2007). Responses of reactive astrocytes containing S100B protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: Implications for wound repair and neurogeneration. *Wound Repair and Regeneration*, 15, 134–146.
- Elizei, S., & Kwon, B. (2017). The translational importance of establishing biomarkers of human spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, 12(3), 385–388.
- Esclarín De Ruz, A., & De Pinto Benito, A. (2002). *La Lesión Medular Vejiga e Intestino*. S.A. Madrid.
- Forner, Á. (2011). *Tetraplejia traumática tras fractura vertebral cervical: estudio comparativo de tratamiento conservador y quirúrgico*. (Tesis Doctoral), Facultad de Medicina: Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Galeiras, R., Ferreira, M., Mourel, M., Montoto, A., & Salvador de la Barrera, S. (2017). Actualización en lesión medular aguda postraumática. Parte 1. *Medicina Intensiva*, 41(4), 237–247.
- Gazzolo, D., & Michetti, F. (2010). Perinatal S100B Protein Assessment in Human Unconventional Biological Fluids: A Minireview and New Perspectives. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2010, 11–15.
- Gómez, F., Sampeieri, A., & Carmona, L. (2013). Clasificación de los biomarcadores en las enfermedades del Sistema Nervioso Central. *Acta Pediátrica de México*, 34(3), 171–172.
- González, S. (2013). *Marcadores hemoquímicos de afectación al tejido nervioso como indicadores de daño en la hipertensión arterial esencial y en el ictus*. (Tesis Doctoral), Facultad de Medicina: Universidad de Ciencias Médicas de la Habana, La Habana.
- Gordillo, E., Egea, J., Rodríguez, A., & Murillo, F. (2016). Utilidad de los biomarcadores en el pronóstico del traumatismo craneoencefálico grave. *Medicina Intensiva*, 40(2),

105–112.

- Grotta, J., Albers, G., Broderick, J., Kasner, S., Lo, E., Mendelow, D., ... Wong, L. (2015). *Stroke Pathophysiology, Diagnosis, and Management* (Sixth Edit).
- Gruener, G., & Biller, J. (2008). Spinal cord anatomy, localization, and overview of spinal cord syndromes. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 14(3), 11–35.
- Hajduková, L., Sobek, O., Prchalová, D., Bílková, Z., Koudelková, M., Lukášková, J., & Matuchová, I. (2015). Biomarkers of Brain Damage: S100B and NSE Concentrations in Cerebrospinal Fluid - A Normative Study. *BioMed Research International*, 2015.
- Haque, A., Capone, M., Matzelle, D., Cox, A., & Banik, N. L. (2017). Targeting Enolase in Reducing Secondary Damage in Acute Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochemical Research*.
- Haque, A., Ray, S., Cox, A., & Banik, N. (2015). Neuron specific enolase: a promising therapeutic target in acute spinal cord injury. *Metabolic Brain Disease*, 31(3), 487–495.
- Heizmann, C., Fritz, G., & Schafer, B. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in Bioscience*, 7, 1356–1368.
- Henao, C., & Pérez, J. (2010). Lesiones medulares y discapacidad : revisión bibliográfica. *Aquichan*, 10, 157–172.
- Hill, R., Zhang, Y., Burke, D., Devries, W., Zhang, Y., Magnuson, D., ... Al, H. (2009). Anatomical and Functional Outcomes following a Precise, Graded, Dorsal Laceration Spinal Cord Injury in C57BL/6 Mice. *Journal of Neurotrauma*, 26, 1–15.
- Jakeman, L., Guan, Z., Wei, P., Ponnappan, R., Dzwonczyk, R., Popovich, P., & Stokes, B. (2000). Traumatic Spinal Cord Injury Produced by Controlled Contusion in Mouse. *Journal of Neurotrauma*, 17(4), 299–319.
- Jazayeri, S., Beygi, S., Shokrane, F., Hagen, E., & Rahimi, V. (2015). Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *European Spine Journal*, 24(5), 905–918.
- Jin, Y., Bouyer, J., Haas, C., & Fischer, I. (2013). Behavioral and anatomical consequences of repetitive mild thoracic spinal cord contusion injury in the rat. *Experimental Neurology*.
- Kawata, K., Liu, C., Merkel, S., Ramirez, S., Tierney, R., & Langford, D. (2016). Blood

- Biomarkers for Brain Injury: What Are We Measuring? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 68, 460–473.
- Kjell, J., & Olson, L. (2016). Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 9(10), 1125–1137.
- Komarowska, M., Debek, W., Wojnar, J., Hermanowicz, A., & Rogalski, M. (2013). Brown-Séquard syndrome in a 11-year-old girl due to penetrating glass injury to the thoracic spine. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*, 23(2), 141–143.
- Kwon, B., Casha, S., Hurlbert, R., & Yong, V. (2011). Inflammatory and structural biomarkers in acute traumatic spinal cord injury. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(3), 425–433.
- Kwon, B., Stammers, A., Belanger, L., Bernardo, A., Chan, D., Bishop, C. M., ... Dvorak, M. (2010). Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 27(4), 669–682.
- Lee, J., & Thumbikat, P. (2015). Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surgery (Oxford)*, 33(6), 238–247.
- Li, M., Wen, H., Yan, Z., Ding, T., Long, L., Qin, H., ... Zhang, F. (2014). Temporal-spatial expression of ENOLASE after acute spinal cord injury in adult rats. *Neuroscience Research*, 79(1), 76–82.
- Liu, L., & Duff, K. (2008). A Technique for Serial Collection of Cerebrospinal Fluid from the Cisterna Magna in Mouse. *Journal of Visualized Experiments*, (21), 1–3.
- Lubieniecka, J., Streijger, F., Lee, J., Stoyanov, N., Liu, J., Mottus, R., ... Tetzlaff, W. (2011). Biomarkers for severity of spinal cord injury in the cerebrospinal fluid of rats. *PLoS ONE*, 6(4), 1–13.
- Ma, J., Novikov, L., Karlsson, K., Kellerth, J., & Wiberg, M. (2001). Plexus avulsion and spinal cord injury increase the serum concentration of S-100 protein: an experimental study in rats. *Scand.J.Plast.Reconstr.Surg.Hand Surg.*, 35(4), 355–359.
- Ma, M., Basso, D., Walters, P., Stokes, B., & Jakeman, L. (2001). Behavioral and Histological Outcomes Following Graded Spinal Cord Contusion Injury in the C57Bl / 6 Mouse. *Experimental Neurology*, 169, 239–254.
- Marenholz, I., Heizmann, C., & Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature).

- Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4), 1111–1122.
- Marquardt, G., Setzer, M., Theisen, A., Tews, D., & Seifert, V. (2011). Experimental subacute spinal cord compression: correlation of serial S100B and NSE serum measurements, histopathological changes, and outcome. *Neurological Research*, 33(4), 421–426.
- Matyas, J., Driscoll, C., Yu, X., Coll-miro, M., Daugherty, S., Renn, C., ... Wu, J. (2017). Truncated TrkB . T1-Mediated Astrocyte Dysfunction Contributes to Impaired Motor Function and Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, 37(14), 3956–3971.
- Mautes, A., Weinzierl, M., Donovan, F., & Noble, L. (2000). Vascular Events After Spinal Cord Injury: Contribution to Secondary Pathogenesis. *Physical Therapy*, 80(7), 673–687.
- Michetti, F., Corvino, V., Geloso, M., Lattanzi, W., Bernardini, C., Serpero, L., & Gazzolo, D. (2012). The S100B protein in biological fluids: More than a lifelong biomarker of brain distress. *Journal of Neurochemistry*, 120(5), 644–659.
- Murua, I. (2015). *Lesión Medular. Tratamiento Revisión de la literatura*. (Tesis de Pregrado).
- Nishida, H. (2014). Biomarkers for Neural Injury and Infection in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 44(6), 1187–1199.
- Ojeda, J., & Icardo, J. (2004). *Neuroanatomía humana Aspectos funcionales y clínicos* (Masson, S.). Barcelona.
- Plaza, V., Pacheco, B., Aguilar, C., Valenzuela, J., & Pérez, J. (2012). Lesión de la médula espinal. Actualización bibliográfica: Fisiopatología y tratamiento inicial. *Coluna/ Columna*, 11(1), 73–76.
- Pouw, M., Kwon, B., Verbeek, M., Vos, P., Van Kampen, A., Fisher, C., ... Van De Meent, H. (2014). Structural biomarkers in the cerebrospinal fluid within 24 h after a traumatic spinal cord injury: A descriptive analysis of 16 subjects. *Spinal Cord*, 52(6), 428–433.
- Pouw, M., Hosman, A., Van, J., Verbeek, M., Vos, P., & Van de Meent, H. (2009). Review Biomarkers in spinal cord injury. *Spinal Cord*, 47(7), 519–525.
- Profyris, C., Cheema, S., Zang, D., Azari, M., Boyle, K., & Petratos, S. (2004).

- Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, 15(3), 415–436.
- Rea, P. (2015). Essential Clinical Anatomy of the Nervous System. In *Essential Clinical Anatomy of the Nervous System*.
- Rodrigo, J. (2002). Sistematización de la médula espinal Correlación anatómica y clínica. *Medicina UPB Medellín Colombia*, 21(2), 119–135.
- Rowland, J., Hawryluk, G., Kwon, B., & Fehlings, M. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus*, 25(5).
- Rundgren, M., Cronberg, T., Friberg, H., & Isaksson, A. (2014). Serum neuron specific enolase - impact of storage and measuring method. *BMC Research Notes*, 7(726), 1–7.
- Sandoval, C., & Peña, G. (2008). Breve historia de Brown-Séquard y su síndrome. A propósito de un caso atípico. *Revista medicina*, 30(1), 27–32.
- Schucht, P., Raineteau, O., Schwab, M., & Fouad, K. (2002). Anatomical Correlates of Locomotor Recovery Following Dorsal and Ventral Lesions of the Rat Spinal Cord. *Experimental Neurology*, 176(1), 143–153.
- Sedaghat, F., & Notopoulos, A. (2008). S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*, 12(4), 198–204.
- Sharif, M., Khormali, M., Rezaei, M., Safdarian, M., Hajighadery, A., Khalatbari, M., ... Rahimi, V. (2017). Animal models of spinal cord injury: A systematic review. *Spinal Cord*, 55(8), 714–721.
- Siddiqui, A., Khazaei, M., & Fehlings, M. (2015). *Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 218). Elsevier B.V.
- Silva, J., Chavarriaga, J., Orrego, P., Iregui, J., Álvarez, D., & Godoy, M. (2016). Función eréctil y salud sexual en hombres con trauma raquimedular: estudio transversal. *Urología Colombiana*, 1–6.
- Singh, A., Tetreault, L., Kalsi, S., Nouri, A., & Fehlings, M. (2014). Global Prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clinical Epidemiology*, 6, 309–331.
- Snell, R. (2007). *Neuroanatomía Clínica*. (Panamericana, Ed.) (6a ed.).

- Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Tubaro, C., Bianchi, R., Giambanco, I., & Donato, R. (2010). S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World Journal of Biological Chemistry*, 8454(7), 209–238.
- Strassburguer, K., Hernández, Y., & Barquín, E. (2004). Lesión Medular: Guía para manejo integral del paciente con LM crónica. *Aspaym Madrid*, (1), 1–161.
- Tascu, A., Iencean, S., & Iencean, A. (2016). New approach based on biomarkers in acute traumatic spinal cord injury. *Romanian Neurosurgery*, 30(2), 147–153.
- Teherán, A., Castro, O., & Frade, L. (2017). Incidencia y Características del Trauma Raquimedular en un Hospital de III Nivel Bogotá 2011 – 2014. *Panamerican Journal of Trauma, Critical Care & Emergency Surgery*, 5(3), 140–147.
- Van Den Berg, M., Castellote, J., Mahillo, I., & De Pedro-Cuesta, J. (2010). Incidence of spinal cord injury worldwide: A systematic review. *Neuroepidemiology*, 34(3), 184–192.
- Witiw, C., & Fehlings, M. (2015). Acute Spinal Cord Injury. *Journal Spinal Disorders*, 28(6), 202–210.
- World Health Organization. (2003). International Perspectives on Spinal Cord Injury. *World Health Organization*, 250.
- Yokobori, S., Zhang, Z., Moghieb, A., Mondello, S., Gajavelli, S., Dietrich, W. D., ... Bullock, M. R. (2015). Acute Diagnostic Biomarkers for Spinal Cord Injury: Review of the Literature and Preliminary Research Report. *World Neurosurgery*, 83(5), 867–878.
- Yuying, C., Ying, M., Vogel, L., & DeVivo, M. (2013). Causes of Spinal Cord Injury. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*, 19(1), 1–8.
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S., Wu, Y., & Chen, W. (2012). Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Indian J Med Res*, 135, 287–296.

# ANEXOS

## **Anexo A** Puntuaciones de la función locomotora en campo abierto

### **PUNTUACIONES DE LAS MEDICIONES BÁSICAS DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN CAMPO ABIERTO PARA RATONES CON LESIÓN MEDULAR**

#### **MOVIMIENTO DE LA PATA POSTERIOR IZQUIERDA**

- 0 Ningún movimiento con la pata rotada hacia fuera
- 1 Ningún movimiento con la pata rotada hacia dentro
- 2 Movimiento ligero con la pata rotada
- 3 Movimiento moderado con la pata rotada
- 4 Movimiento extenso con la pata rotada
- 5 Movimiento ligero con la pata paralela
- 6 Movimiento moderado con la pata paralela
- 7 Movimiento extenso con la pata paralela

#### **APOYO DE LA PATA IZQUIERDA**

- 0 Sin apoyo
- 1 Apoyo dorsal (sin apoyo plantar)
- 2 Apoyo plantar ocasional y dorsal
- 3 Apoyo plantar frecuente y dorsal
- 4 Apoyo plantar constante

#### **POSICIÓN DEL TRONCO**

- 0 Tronco con inclinación severa y cola contralateral
- 1 Tronco con inclinación severa y cola hacia arriba o abajo
- 2 Tronco con inclinación moderada y cola contralateral
- 3 Tronco con inclinación moderada y cola hacia arriba o abajo
- 4 Tronco con inclinación moderada y cola paralela
- 5 Tronco sin inclinación y cola hacia arriba
- 6 Tronco sin inclinación y cola hacia arriba y abajo
- 7 Tronco sin inclinación y cola hacia abajo
- 8 Tronco sin inclinación y cola paralela



## **Anexo B** Protocolo para la recolección de LCR

### **TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE LA CISTERNA MAGNA EN RATÓN**

1. Después de inducir un plano quirúrgico de anestesia, sobre el estereomicroscopio previamente desinfectado, el ratón se posiciona en decúbito prono y se realiza sobre la piel una incisión sagital inferior al occipucio
2. Efectuar divulsión del tejido subcutáneo y los músculos de modo que la cabeza del ratón forme un ángulo de casi 135 °C con el cuerpo
3. Bajo el estereomicroscopio, la duramadre de la cisterna magna se presenta como un brillante y claro triangulo inverso través del cual el bulbo raquídeo, la arteria espinal posterior y el espacio del LCR son visibles
4. Limpiar la duramadre con un hisopo de algodón estéril y a continuación penetrar con un tubo micro-hematocritos (Vitrex Medical Ref. 161315) la cisterna magna a través de la duramadre, lateral a la arteria espinal posterior. Y la presión positiva entre el líquido y la superficie, hace que el LCR ascienda a través del tubo capilar
5. Retirar con cuidado el tubo capilar y conectarlo a una jeringa de 3 mL a través de un tubo de polietileno de diámetro interno de 1 mL. Pasar el LCR a un eppendorf de 0,5 mL y conservar a -80°C
6. Al terminar de muestrear el LCR, suturar los músculos y la piel en planos independientes e inyectar 1 mL de solución salina vía subcutánea para evitar la deshidratación. Mantener el ratón en almohadillas térmicas hasta su recuperación.

## **Anexo C** Protocolo para la tinción con azul de coomassie

### **PROTOCOLO PARA LA TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE G-250**

#### **PREPARACIÓN AZUL DE COOMASSIE G-250 (volumen total 100 mL)**

Pesar 100 mg de azul de coomassie

Adicionar 50 mL de metanol

Añadir 10 mL de ácido acético

Aforar a volumen de 100 mL con agua desionizada

La solución se lleva a baño maría 20 minutos y se filtra (Filter Discs Qual 110 mm). Se vuelve a aforar a 100 mL con ácido acético y se conserva a temperatura ambiente en tarro ámbar

#### **TINCIÓN DE GELES**

- Una vez haya salido el gel de la electroforesis, dejar en shaker toda una noche el gel sumergido en azul de coomassie
- Al siguiente día, se recicla el azul de coomassie y se sumerge el gel en decolorante fuerte (metanol 250 mL, ácido acético 50 mL, agua desionizada, 200 mL) 2 veces, 30 minutos en shaker
- En seguida, se sumergen los geles en decolorante débil (metanol 25 mL, ácido acético 50 mL, agua desionizada, 425 mL)
- Para finalizar se dejan los geles en agua con un poco de la solución anterior (decolorante débil) durante un momento y se toma el registro fotográfico.

## **Anexo D** Preparación de membranas PVDF para Western blot

### PROTOCOLO PARA EL USO DE MEMBRANAS PVDF (DIFLUORURO DE POLIVINILIDENO) ANTES Y DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

#### ANTES DE TRANSFERENCIA

Una vez cortadas las membranas PVDF, antes de utilizarse para armar el paquete de transferencia, estas se deben sumergir en:

- Metanol, 10 segundos
- Agua desionizada, 2 minutos
- Tampón de transferencia sin SDS, 5 minutos

#### DESPUÉS DE TRANSFERENCIA

Al finalizar la transferencia y antes de proceder a bloquear las membranas, estas se deben dejar secar completamente y sumergir de nuevo en:

- Metanol, 10 segundos
- Agua desionizada, 2 minutos.

## **Anexo E** Protocolo stripping suave

### PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTICUERPOS DE MEMBRANAS DE TRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

#### STRIPPING SUAVE BUFFER (1 L)

Pesar 15 g de glicina

Pesar 1 g de SDS

Adicionar 10 mL de Tween 20

Disolver en 800 mL de agua destilada desionizada

Ajustar pH a 2,2


Llevar a volumen hasta 1 L con agua destilada desionizada

#### PROCEDIMIENTO

Después de haber incubado y revelado el anticuerpo primario:

- Cubrir la membrana en su totalidad en la solución buffer de stripping suave dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente
- Realizar lavado con PBS 1x pH 8,0 dos veces 10 minutos
- Lavar con TBS-T 0,01% tres veces
- Lavar con TBS-T 0,05% durante 15 minutos
- Lavar con TBS-T 0,05% durante 5 minutos
- Lavar con TBS 1x pH 7,5 durante 5 minutos

Volver a bloquear la membrana para volver a incubar en anticuerpo primario

 Universidad del Tolima	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página <b>1</b> de <b>3</b>
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

Claudia Liliana Carbonell Gutierrez	con C.C N°	1.110.524.491
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

**Autorizar**

☒

**No Autorizar**

☐

**Motivo:**


La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

 Universidad del Tolima	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “**...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “**...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo: **EVALUACIÓN DE LA MODULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS NSE y S100 $\beta$  COMO POSIBLES BIOMARCADORES TEMPRANOS EN UN MODELO MURINO DE LESIÓN MEDULAR ESPINAL**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

**Bióloga**

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Artículo publicado en revista:


---

- Capítulo publicado en libro:

---

- Conferencia a la que se presentó:

III Semana de la Ciencia Animal 2018, sesión de Posters, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima


 Universidad del Tolima	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: **22** Mes: **Agosto** Año: **2018**

Autores:

Firma

Nombre:	Claudia Liliana Carbonell Gutierrez		C.C.	1.110.524.491
Nombre:			C.C.	
Nombre:			C.C.	
Nombre:			C.C.	

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.